

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE POUR L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
GUY SAMSON

MAITRISE ES SCIENCES (UNIVERSITE LAVAL)

MODIFICATIONS DU TRANSPORT D'ÉLECTRONS DANS LE
PHOTOSYSTEME II INHIBÉ PAR LE MERCURE ET LE CUIVRE

OCTOBRE 1989

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RESUME

Le propos de ma thèse porte sur l'inhibition de l'activité photochimique du photosystème II (PSII) par le mercure et le cuivre. Cette recherche visait tout d'abord à mieux caractériser ces effets inhibiteurs sur le transport d'électrons dans le PSII, pour ensuite mieux comprendre certains aspects fonctionnels et structurels du transport d'électrons au niveau du PSII.

Les résultats obtenus avec l'algue verte Dunaliella tertiolecta indiquent premièrement que le mercure et le cuivre affectent les PSII par une inhibition de type tout ou rien, c'est-à-dire qu'une portion de la population des PSII dans les thylacoïdes est totalement inhibée par le mercure et le cuivre, alors que l'autre portion des PSII ne semble pas affectée. J'ai démontré que les PSII de type Q_B sont les plus sensibles aux effets du mercure et du cuivre. Cette observation a d'importantes conséquences physiologiques puisque les PSII de type Q_B sont les seuls responsables de la réduction des plastoquinones et par conséquent, du transport d'électrons allant de l'eau jusqu'au NADP. Ainsi, j'ai démontré chez des thylacoïdes d'orge que l'inhibition des PSII de type Q_B par le cuivre entraîne l'inactivation des mécanismes de redistribution de l'énergie d'excitation absorbée par les complexes collecteurs de lumière vers les photosytèmes I et II.

Les études spectrophotométriques effectuées apportent une contribution importante à la compréhension des effets inhibiteurs du mercure et du cuivre au niveau des fonctions du PSII. Tout d'abord, les résultats indiquent clairement que ni le mercure ni le cuivre n'affectent significativement la photochimie primaire au niveau du centre réactionnel des PSII, telle que mesurée par le changement électrochromique C-550. Ces résultats contrastent en apparence avec les diminutions de la fluorescence et de dégagement d'oxygène causées par ces métaux lourds. Cependant, j'ai démontré pour la première fois que le mercure stimule l'oxidation du cytochrome b-559 (cyt b-559) par le centre réactionnel du PSII, P680, lors d'un transport cyclique d'électrons induit autour du centre réactionnel du PSII. Par contre, le cuivre 1) augmente significativement l'amplitude du changement d'absorbance lors la photoréduction du cyt b-559 et 2) modifie le potentiel redox du cyt b-559 HP et LP et 3) diminue le taux de photooxidation du cytochrome b-559 par P680. Ces interactions du cuivre avec le cyt b-559 résulteraient d'une perte d'interaction entre le cyt b-559 et P680, suggérant un effet du cuivre sur la structure membranaire et/ou polypeptidique du PSII. Ainsi, ces conclusions contribuent à une meilleure compréhension du rôle du cyt b-559 dans le PSII, en mettant en évidence l'importance des interactions structurelles entre celui-ci et le centre réactionnel du PSII.

REMERCIEMENTS

Je ne sais comment témoigner toute ma gratitude envers Radovan Popovic, pour sa confiance, son amitié et son support inestimable. Les trois années passées sous sa direction m'ont énormément apporté à plusieurs égards.

Je tiens aussi à remercier pour leur précieuse amitié tous mes collègues du laboratoire, Marc, Michelle, Alexandre, Michel, Sonya, Claude, Pascal, Luc, Jean-Claude et Jean.

Merci à mes parents pour le support constant tout au long de mes études. Merci Michelle, pour ta compréhension et tes encouragements. Cette thèse représente notre succès.

TABLES DES MATIERES

	page
RESUME	i
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBREVIATIONS	xvii
 CHAPITRE 1: INTRODUCTION	 1
1.1 La photosynthèse	1
1.1.1 Le chloroplaste	2
1.1.2 L'absorption de l'énergie lumineuse	5
1.1.3 Séparation de charges et transport d'électrons	8
1.1.4 Photophosphorylation	12
1.1.5 Assimilation du CO ₂	13
 1.2 Aspects structurels et fonctionnels du Photosystème II.	14
1.2.1 Composition et structure du Photosystème II	15
1.2.2 Emission de la fluorescence variable par le Photosystème II	21
1.2.3 Hétérogénéités des Photosystèmes II	25
1.2.4 Les transitions d'états	27

1.3 Etat actuel de la recherche sur les effets inhibi- teurs du mercure sur le transport d'électrons dans le PSII	29
1.4 Etat actuel de la recherche sur les effets inhibi- teurs du cuivre sur le transport d'électrons dans le PSII	31
1.5 Importance et objectifs de la recherche	34
CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES	40
2.1 Matériel biologique	40
2.1.1 Culture et préparation des algues	40
2.1.2 Culture des plantules d'orge et préparation des thylacoïdes	41
2.2 Méthodes analytiques	44
2.2.1 Dégagement d'oxygène mesuré par polarographie	44
2.2.2 Mesure et analyse de la fluorescence A) à la température ambiante	46
B) à basse température (77°K).....	49
2.2.3 Spectroscopie par différences d'absorbance	50
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION	53

3.1 Caractérisation de l'inhibition de l'activité du PSII par le mercure chez <u>Dunaliella tertiolecta</u>	53
3.2 Analyse de la baisse de la fluorescence variable cau- sée par le mercure grâce à la méthode Stern-Volmer	64
3.3 Etude de l'hétérogénéité fonctionnelle des PSII par l'effet inhibiteur du mercure	72
3.4 Evidences d'un transport cyclique d'électrons autour du PSII induit par le mercure chez les thylacoïdes d'orge. 78	
3.5 Caractérisation de l'inhibition de l'activité du PSII par le cuivre chez <u>Dunaliella tertiolecta</u>	88
3.6 Interactions du cuivre sur le transport d'électrons et le cytochrome b-559 dans les thylacoïdes d'orge	94
3.7 Evidences de l'inhibition des transitions d'états dans les thylacoïdes suite à l'effet du cuivre sur le PSII..	114
CONCLUSIONS	123
REFERENCES	130

LISTE DES TABLEAUX

page

Tableau

1. Composition chimique des solutions utilisées pour
l'extraction, la conservation et la resuspension
des fragments de thylacoïdes 43
2. Effets du CuSO_4 (30 μM) sur les intensités de la
fluorescence variable mesurées en absence et en pré-
sence de DBMIB (0.5 μM) et de Glucose Oxydase (3.8
unités/ml + 50 mM glucose).....100
3. Effet de la phosphorylation sur les rapports des in-
tensités de fluorescence aux pics F740/F694 mesurés à
77°K chez des thylacoïdes incubés en absence et en
présence de 20 μM CuSO_4 121

LISTE DES FIGURES

Figure	page
Fig.1 Vue tridimensionnelle d'un chloroplaste typique	3
Fig.2 Modèle de la structure des thylacoïdes chez les plantes supérieures et les algues vertes (tiré de Hader et Tevini, 1987)	4
Fig.3 Spectre d'absorption de l'ensemble des pigments photosynthétiques et chez les plantes supérieures et les algues vertes	6
Fig.4 Représentation schématique de l'organisation des différents pigments associés au photosystème II.....	7
Fig.5 Modèle du complexe collecteur de lumière associé au photosystème II (CCL-II) A) structure tertiaire d'une sous-unité B) Structure quaternaire (adapté de Thornber, 1986)	8
Fig.6 Version actuelle du schéma en "Z" décrivant la séquence et les potentiels d'oxido-réduction au point milieu des différents transporteurs d'électrons dans les thylacoïdes	10
Fig.7 Séquence des transporteurs d'électrons impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction dans le com- plexe du photosystème II avec les temps de trans- fert d'électrons (tiré de Govindjee <u>et al.</u> , 1985) ...	16
Fig.8 Structure du complexe PSII démontrant l'organisa- tion entre les polypeptides et leurs composantes	

redox	18
Fig.9 Courbes d'induction de fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps avec les niveaux caractéristiques O-I-D-P-S (tiré de Braintais <u>et al.</u> , 1986)	22
Fig.10 Modèle résumant les différentes étapes du proces- sus de régulation de l'énergie d'excitation par les transitions d'états dans les thylacoïdes (adapté de Hader et Tevini, 1987)	28
Fig.11 Analyse des principaux paramètres de fluorescence. A) L'aire complémentaire calculée par $[F_{max}-F(t)]dt$, B) le taux de photoréduction de Q_A estimé par la pente du $\ln [F_{max}-F(t)]$ et C) analyse semilogari- thmique de l'accroissement de l'aire complémentaire à partir d'une courbe typique d'induction de fluo- rescence variable en présence de DCMU.....	48
Fig.12 Spectre caractéristique d'émission de fluorescence mesuré à 77°K chez des thylacoïdes	50
Fig.13 Dégagement d'oxygène par les cellules de <u>Dunaliella</u> - <u>tertiolecta</u> en fonction du temps d'incubation en présence de 50 (●), 100 (■) et 200 (▲) μM $HgCl_2$	54
Fig.14 Dégagement d'oxygène par les cellules de <u>Dunaliella</u> <u>tertiolecta</u> incubées pendant 75 min en présence de différentes concentrations de $HgCl_2$	56
Fig.15 Courbes d'induction de fluorescence émises par les	

x

cellules de <u>Dunaliella tertiolecta</u> incubées en présence de différentes concentrations de HgCl_2	57
Fig.16 Pourcentages des intensités de la fluorescence variable mesurés en présence et en absence de DCMU en fonction de la concentration de HgCl_2 chez <u>D.tertiolecta</u>	59
Fig.17 Courbes d'induction de fluorescence mesurées en présence de DCMU chez des algues traitées ou non avec différents additifs: A) contrôle, B) NH_2OH 10 mM, C) HgCl_2 50uM et D) NH_2OH 10 mM + HgCl_2 50 uM	60
Fig.18 Taux de photoréduction de Q_A évalué en présence de DCMU par la pente de $\ln [F_{\text{max}} - F(t)]$ en fonction du temps et aire complémentaire mesurée en présence et en absence de DCMU chez des cellules d'algues incubées avec différentes concentrations de HgCl_2 ...	62
Fig.19 Pourcentages de la fluorescence variable mesurée en présence de DCMU émise par des cellules de <u>D.tertiolecta</u> incubées en présence de différentes concentrations de HgCl_2 pendant 15 (▲), 30 (●), 45 (■), 60 (△) et 75 (○) min	65
Fig.20 Concentration de HgCl_2 requise pour atténuer 50% de la fluorescence variable en fonction du temps d'incubation	66
Fig.21 Représentation de la baisse de la fluorescence variable causée par le mercure après 15 (▲), 30	

(●), 45 (■), 60 (△) et 75 (○) min d'incubation selon l'équation classique de Stern-Volmer.....	67
Fig.22 Diminution de la baisse de la fluorescence variable causée par le mercure après 15 (▲), 30 (●), 45 (■), 60 (△) et 75 (○) min d'incubation selon l'équation modifiée de Stern-Volmer.....	68
Fig.23 Forme linéarisée de la relation décrivant l'atténuation de la fluorescence chez <u>D.tertiolecta</u> et la concentration de mercure après 75 min d'incubation selon l'équation Stern-Volmer re-modifiée	71
Fig.24 Pourcentages des fluorescences variables lente (Fv^{DP}) et rapide (Fv^{O^+}) mesurées chez <u>D.tertiolecta</u> après 75 min d'incubation en fonction de la concentration de $HgCl_2$	74
Fig.25 Corrélation entre l'intensités de Fv^{DP} et le taux de dégagement d'oxygène mesurés à une concentration donnée de $HgCl_2$	75
Fig.26 Proportions des PSII de type non- Q_B évaluées par le rapport Fv^{O^+}/Fv en fonction de concentration de $HgCl_2$	76
Fig.27A Courbes d'induction de fluorescence mesurées en présence de DCMU à partir de cellules de <u>D.tertiolecta</u> incubées en présence de différentes concentrations de $HgCl_2$. B) Analyse semilogarithmique de l'accroissement de l'aire complémentaire correspon-	

	dante aux courbes de fluorescence de la Fig.27A	77
Fig.28	Intensités de la fluorescence variable chez des thylacoïdes d'orge incubés en présence de 25 uM HgCl ₂ en fonction du temps d'incubation	79
Fig.29	Relation entre la concentration de HgCl ₂ et la fluorescence variable chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 min en présence de différentes concentrations de HgCl ₂	79
Fig.30	Diminution des taux de dégagement d'oxygène chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 minutes en présence de différentes concentrations de HgCl ₂	80
Fig.31	Courbes d'induction de fluorescence mesurées chez des thylacoïdes intacts ou traités avec différents additifs: A) contrôle, B) NH ₂ OH 10 mM, C) HgCl ₂ 50uM et D) NH ₂ OH 10 mM + HgCl ₂ 50 uM.....	81
Fig.32	Cinétiques du changement électrochromique C-550 mesuré entre 540-550 nm, obtenues chez thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 min à l'obscurité en présence de 0 et 100 uM HgCl ₂ , 5 uM DCMU et 0.5 uM Gramicidine	83
Fig.33	Photoréduction du cyt b-559 chez des thylacoïdes après 15 min d'incubation à l'obscurité en présence de 2 mM FeCN et de 0 ou 100 uM HgCl ₂	84
Fig.34	Caractérisation des états rédox du cytochrome b-559 chez des thylacoïdes d'orge (60 ug Chl tot/ml) incubés	

15 min à l'obscurité en absence (A) et en présence (B) de 100 μM HgCl_2 . C) Différence entre les spectres mesurés entre 540 et 580 nm chez des thylacoïdes réduits par le dithionite moins le spectre mesuré chez des thylacoïdes oxydés par le FeCN . Les concentrations utilisées sont 2 mM pour le FeCN , 4 mM pour le HQ et un excès de dithionite86-87

Fig.35 Courbes d'induction de fluorescence émises par les cellules de D.tertiolecta incubées pendant 15 minutes en présence de différentes concentrations de CuSO_4 89

Fig.36 A) Pourcentages des intensités de la fluorescence variable maximale mesurée en présence de DCMU en fonction de la concentration de CuSO_4 . B) Rendement photochimique de la fluorescence mesuré par $1-(F_0/F_{\text{max}})$ en fonction de la concentration de CuSO_4 90

Fig.37 Courbes d'induction de fluorescence mesurées en présence de DCMU chez des algues traitées avec différents additifs: A) Contrôle, B) NH_2OH 10 mM, C) CuSO_4 70 μM et D) NH_2OH 10 mM + CuSO_4 70 μM 91

Fig.38 Taux de photoréduction de Q_A évalué en présence de DCMU par la pente de $\ln [F_{\text{max}}-F(t)]$ en fonction du temps (●) et aire complémentaire (■) mesurée en présence de DCMU chez des cellules d'algues incubées avec différentes concentrations

de CuSO_4	93
Fig.39 Intensités de la fluorescence variable chez des thylacoïdes d'orge mesurées en absence et en pré- sence de DCMU 5 μM en fonction de la concentration de CuSO_4	95
Fig.40 Réponse de l'électrode spécifique au cuivre "modèle Orion 94-29" à la présence de différentes con- centrations de CuSO_4 dans le milieu de resus- pension des thylacoïdes	97
Fig.41 Pourcentages des intensités de fluorescence varia- ble des thylacoïdes d'orge incubés en présence de 0 et 30 μM CuSO_4 en fonction de la concentration en DCMU	98
Fig.42 Cinétiques du changement d'absorbance C-550 (ΔA 540 550 nm) induit par une illumination continue et mesuré en présence de DCMU 5 μM et de gramici- dine 0.5 μM , ainsi qu'en absence et en présence de CuSO_4 50 μM	101
Fig.43 Cinétiques de la photoréduction du cyt b-559 chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 min à l'obscurité en présence de 2 mM FeCN et de 0 ou 100 mM CuSO_4	103
Fig.44 Caractérisation des états rédox du cytochrome b-559 chez des thylacoïdes d'orge (60 μg Chl tot/ml) incubés 15 min à l'obscurité en absence et en présence de 100 μM CuSO_4 . Les concentrations	

- sont de 2 mM pour le FeCN, de 4 mM pour le HQ
et un excès de dithionite106
- Fig.45 Différence entre les spectres mesurés de 540 à 580
nm chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15
min à l'obscurité en présence de 100 uM CuSO₄
moins le spectre mesuré en absence de cuivre. 2mM
FeCN ont été ajoutés 1 minute avant les mesures.....107
- Fig.46 Photoréduction et caractérisation des états rédox
du cytochrome b-559 chez des thylacoïdes d'orge
(60 ug Chl tot/ml) incubés 15 min à l'obscurité
en absence et en présence de 100 uM CuSO₄. Les
conditions expérimentales sont identiques à celles
utilisées à la Fig.44109
- Fig.47 Photooxydation du cytochrome b-559 induite par
l'addition de 5 uM DCMU chez des thylacoïdes incu-
bés à l'obscurité en absence et en présence de 100
uM CuSO₄111
- Fig.48 Intensités de la fluorescence variable en fonction
de la concentration de CuSO₄ chez des thylacoïdes
incubés en présence et en absence de 0.2 mM ATP.....116
- Fig.49 Baisse normalisée de la fluorescence variable
attribuée à la phosphorylation des CCL-II en fonc-
tion de la concentration de CuSO₄117
- Fig.50 Intensités de la fluorescence variable lente (mon-
tée D-P) en fonction de la concentration de CuSO₄
chez des thylacoïdes incubés en présence et en ab-

sence de 0.2 mM ATP.....	118
Fig.51 Spectres d'émission de fluorescence à basse température (77°K) chez des thylacoïdes non phosphorylés et phosphorylés (0.2 mM ATP) en absence et en présence de 20 uM CuSO ₄	119

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADP: adénosine diphosphate

ATP: adénosine triphosphate

CCL: complexe collecteur de lumière

CDO: complexe de dégagement d'oxygène

Chl: chlorophylle

Cyt: cytochrome

DBMIB: 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-p-benzoquinone

DCMU: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl urée

DCPIP: dichlorophénol-indophénol

DPC: diphénylcarbazine

Em: potentiel rédox moyen

FeCN: ferricyanure

Fmax: niveau de fluorescence maximal mesuré en présence de DCMU

Fv: fluorescence variable

Fvmax: niveau de fluorescence variable maximal mesuré en présence de DCMU

Fv^{OI}: montée de la fluorescence entre les niveaux caractéristiques O et I.

Fv^{DP}: montée de la fluorescence entre les niveaux caractéristiques D et P.

HEPES: acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique

kDa: kiladalton

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

O,I,D,P,S,M: niveaux caractéristiques de la fluorescence

pBQ: para-benzoquinone

PQ: plastoquinone

Phéo: phéophytine

PSI: photosystème I

PSII: photosystème II

P680: centre réactionnel du PSII

P700: centre réactionnel du PSI

Q_A: accepteur primaire d'électrons du PSII

Q_B: accepteur secondaire d'électrons du PSII

Z: donneur primaire d'électrons du PSII

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Chez les organismes photosynthétiques, l'exploitation de l'énergie solaire par le Photosystème II (PSII) crée un transport d'électrons responsable du dégagement d'oxygène et de la production d'ATP et de NADPH. Malgré toute l'importance biologique de ces réactions, la compréhension de plusieurs phénomènes concernant le transport d'électrons dans le PSII demeure toujours incomplète. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques au PSII constitue une approche privilégiée dans l'étude des différentes propriétés de celui-ci. Outre un intérêt toxicologique évident, la caractérisation des effets inhibiteurs du mercure et du cuivre sur le transport d'électrons dans le PSII pourrait permettre de mieux comprendre certains aspects structurels et fonctionnels du PSII. Avant de présenter mes objectifs spécifiques de recherche, il est important de discuter du contexte général de la photosynthèse et de façon plus détaillée, de certains aspects du PSII.

1.1 La photosynthèse: De tous les processus dans la nature, la photosynthèse est sûrement le plus fondamental: les végétaux transforment une forme d'énergie très "fugitive", la lumière, en une énergie chimique beaucoup plus stable, les glucides. Ces produits de réaction sont synthétisés dans les chloroplastes à partir de l'eau et du CO₂ atmosphérique. Ils servent, avec l'oxygène libéré lors de la

photolyse de l'eau, de source d'énergie aux organismes hétérotrophes (Bidwell, 1979). La meilleure approche pour comprendre ce processus complexe est de distinguer trois principales étapes:

1. l'absorption et la rétention de l'énergie lumineuse,
2. la conversion de l' énergie lumineuse en énergie chimique,
3. la stabilisation et l'emmagasinement de l'énergie chimique sous une forme plus stable.

1.1.1 Le chloroplaste

Les trois étapes de la photosynthèse ont lieu dans le chloroplaste (Fig.1). Chaque chloroplaste est entouré par une double membrane séparant la phase interne, appelée le stroma, du cytoplasme cellulaire. Le stroma contient les enzymes nécessaires à la fixation du CO_2 et à la synthèse des glucides. Il y a aussi dans le stroma un système membranaire tridimensionnel, les thylacoïdes, spécialisées dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. Ces membranes ont l'aspect de vésicules aplaties et sont souvent empilées pour former les grana, ceux-ci étant reliés par des thylacoïdes simples et non-empillés, les thylacoïdes stromatiques (Hooper, 1984; Ort, 1986).

De façon générale, les thylacoïdes contiennent quatre types d'unités impliquées dans les réactions photosynthétiques: 1) les deux complexes collecteurs de lumière (CCL-I et CCL-II) formés de protéines et de pigments et impliqués dans

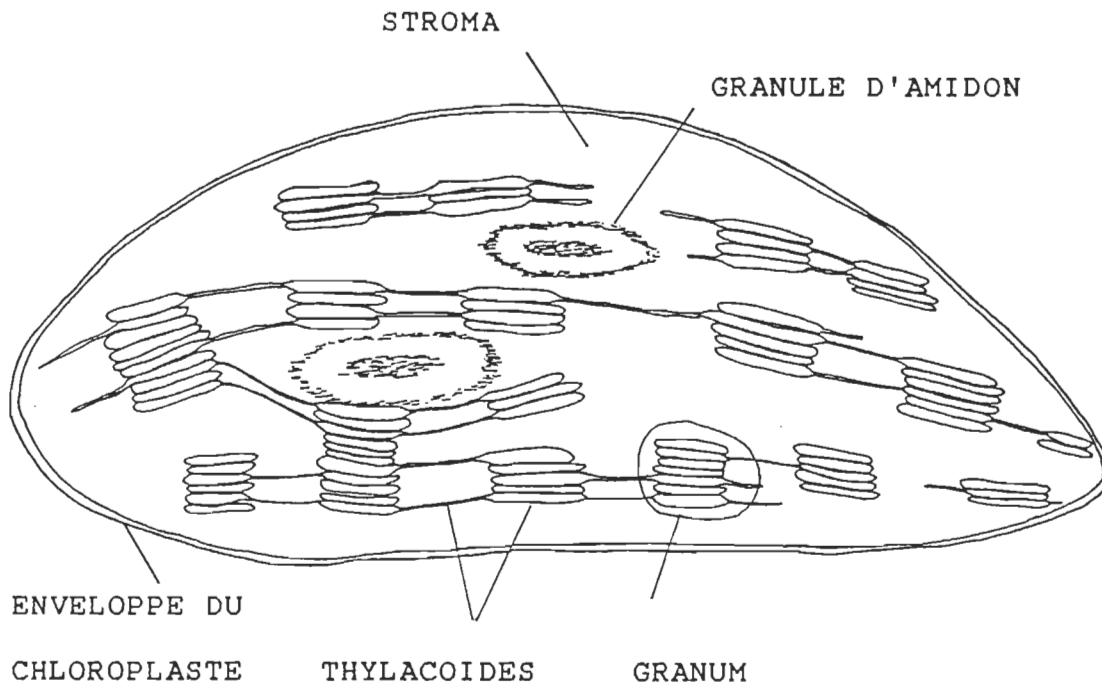


Fig.1 Vue tridimensionnelle d'un chloroplaste typique

l'absorption de la lumière 2) les deux complexes photochimiques (photosystèmes I et II) vers où l'énergie d'excitation est canalisée pour réaliser les réactions photochimiques primaires 3) les transporteurs d'électrons reliant les deux photosystèmes, dont les plastoquinones, les complexes cyt b-f et les plastocyanines et 4) le facteur de couplage (ATPase) responsable de la synthèse de l'ATP utilisé lors de la fixation du CO_2 . Un modèle de l'arrangement spatial entre ces différentes unités fonctionnelles est présenté à la Fig.2. Ces composantes sont distribuées dans un environnement lipidique complexe. Le rôle des lipides membranaires dans les fonctions et l'organisation structurelle des thylacoïdes est capital puisqu'ils maintiennent une conformation et une orien-

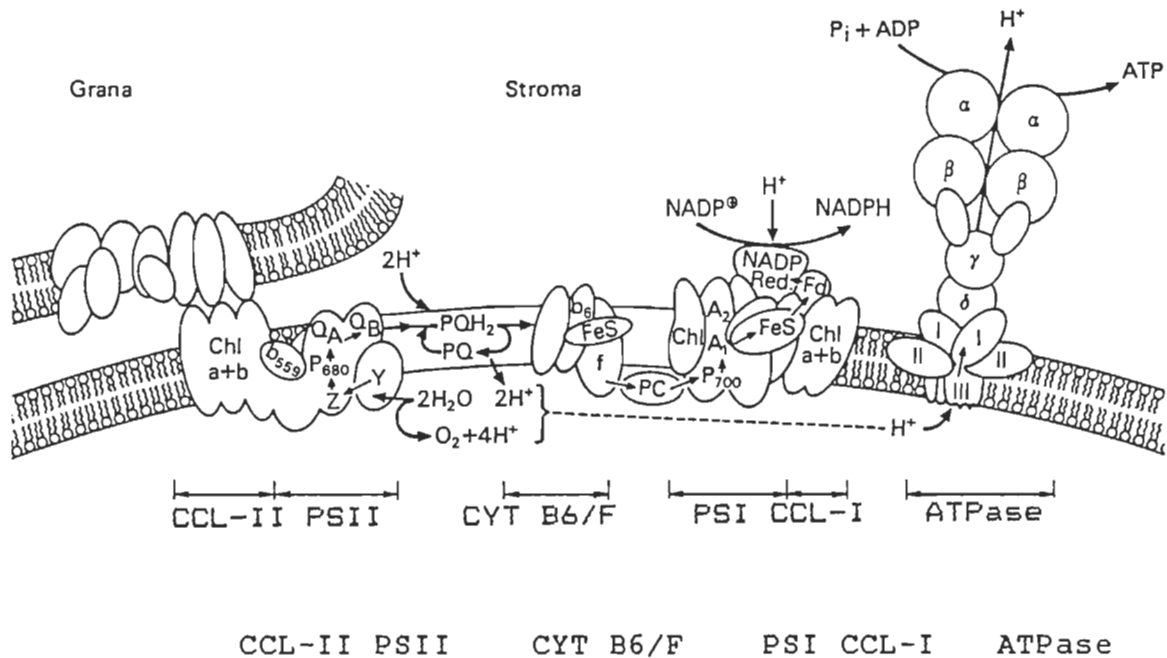


Fig.2 Modèle de la structure des thylacoïdes chez les plantes supérieures et les algues vertes (tiré de Hader et Tevini, 1987).

tation transmembranaire appropriées pour les protéines (Siegenthaler et Rawyler, 1986). En effet, les protéines ne peuvent être vues comme flottant librement dans un "bain" de lipides, puisque des contraintes thermodynamiques imposent une étroite association structurale entre les protéines et les lipides (Israelachvili et al., 1980). Ainsi, des lipides spécifiques seraient essentiels pour certaines fonctions photosynthétiques, dont la photolyse de l'eau au niveau du PSII (Gounaris et al., 1983).

Suite aux observations par microscopie optique et électro-
nique et aux résultats de caractérisation biochimique, nous savons que les différentes unités fonctionnelles sont distribuées différemment dans les régions granaires et stromatiques des thylacoïdes. La majorité des PSII et leurs

CCL-II se retrouvent dans les thylacoïdes densément empilés. De plus, des travaux récents indiquent que les PSII stromatiques sont différents au point de vue structurel et/ou fonctionnel des PSII granaires (Andréasson et al., 1988). De plus, les thylacoïdes stromatiques contiennent les PSI et leurs CCL-I, ainsi que les complexes cytochrome b-f et les facteurs de couplage (Hader et Tevini, 1987).

Toutes ces différentes unités fonctionnelles sont directement impliquées dans les trois principales étapes de la photosynthèse présentées plus haut, soit l'absorption de la lumière, les réactions photochimiques et biochimiques nécessaires à la fixation du CO₂.

1.1.2 L'absorption de l'énergie lumineuse

Les pigments photosynthétiques associés aux protéines des CCL insérées dans la structure membranaire des thylacoïdes sont responsables de l'absorption et du transfert de l'énergie lumineuse vers les PSI et PSII. Chez les plantes supérieures et les algues vertes, les principaux pigments sont les chl a et b, représentant environ 20-22% du poids des lipides totaux dans les thylacoïdes (Hooper, 1984). D'autres pigments du type caroténoïde (surtout le b-carotène et la lutéine) comptent près de 3% du poids des lipides totaux. Cette diversification des pigments photosynthétiques a un double rôle, soit augmenter l'amplitude du spectre de la lumière pouvant être utile pour la photosynthèse et aussi assurer une certaine photopro-

tection (Clayton, 1980). Les Chl et autres pigments ont des maxima d'absorption à des longueurs d'ondes différentes couvrant une partie de la région de la lumière visible entre 435 et 700, avec un creux entre 550 et 640 (Fig.3).

L'absorption d'un quantum de lumière par les pigments photosynthétiques cause la transition d'un état fondamental à un état excité. L'énergie du pigment excité est généralement transférée aux autres pigments avoisinants (Foyer, 1984). Ce transfert d'énergie s'effectue d'une molécule à une autre ou d'un groupe de molécules à un autre. Puisque le bassin de pigments est hétérogène, la migration de cette énergie d'excitation est directionnelle, allant de la périphérie des antennes jusqu'aux centres réactionnels (Foyer, 1984). Une

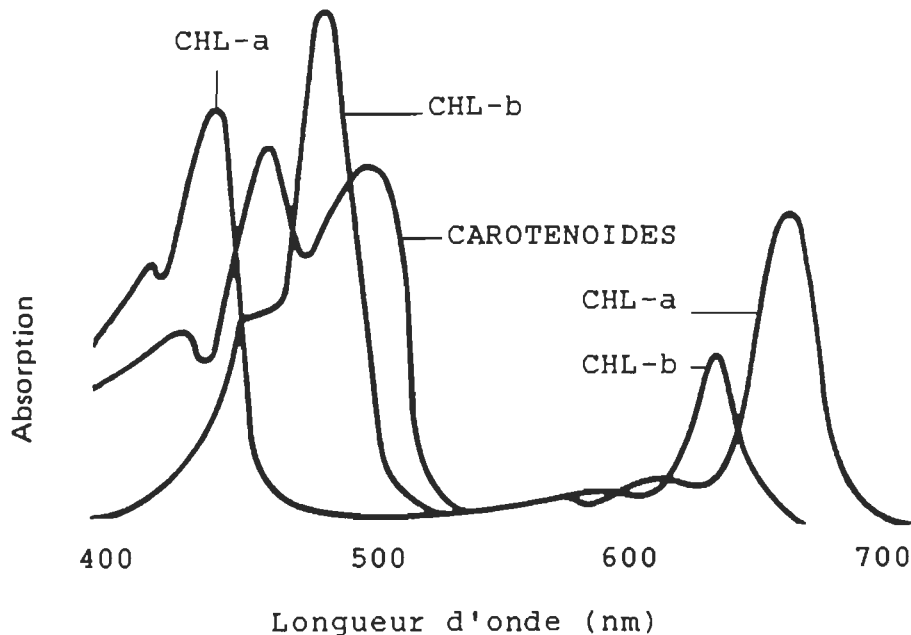


Fig.3 Spectre d'absorption des pigments photosynthétiques chez les algues vertes et les plantes supérieures.

représentation schématique de l'organisation des pigments associés au PSII est présentée à la Fig.4.

La grande efficacité dans le transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques est possible grâce à l'organisation des pigments dans les complexes chlorophylles-protéines. Ces complexes consistent en différents agrégats lipoprotéiques, composés de plusieurs polypeptides (Foyer, 1984). Nous pouvons distinguer les deux complexes intimement associés aux centres réactionnels des PSI et PSII (les "core complexes", les CC-I et CCII), et les deux complexes mobiles collecteurs de lumière (CCL-I et CCL-II) (Staehelin, 1986). Le CC-I est composé d'au moins deux apo-protéines de 60-70 kDa, tandis que le CC-II est

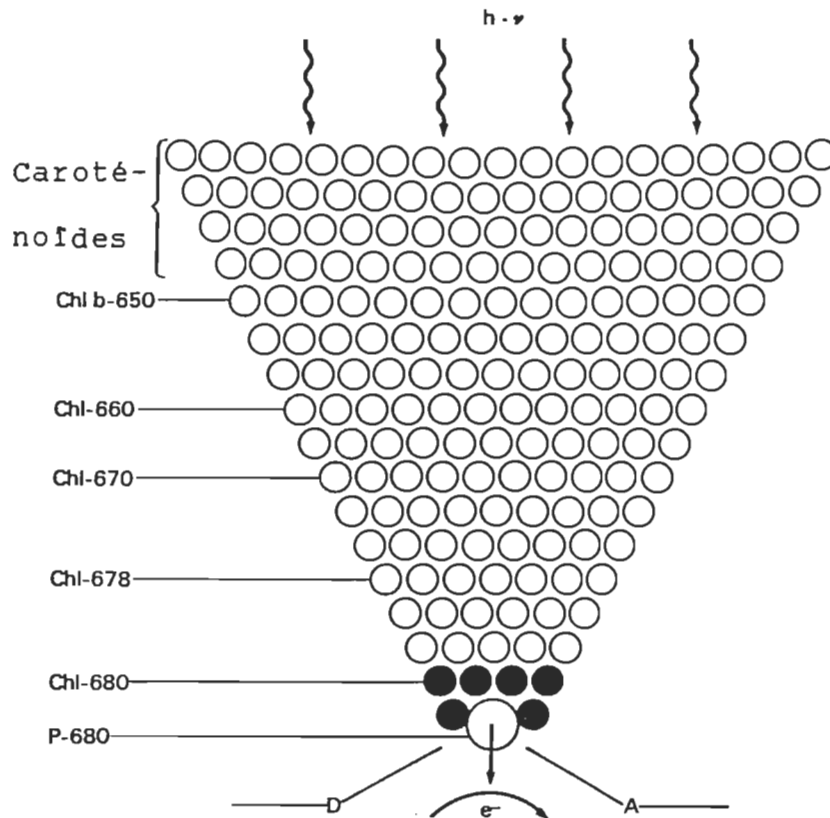


Fig.4 Représentation schématique de l'organisation des différents pigments associés au photosystème II.

composé des polypeptides 43 et 47 kDa. Le CCL-I est formé par deux polypeptides de 20 et 23 kDa (Ort, 1986) alors que le CCL-II serait, d'après le modèle de Kühlbrandt (1984), un trimère de trois sous-unités structurellement équivalentes de 24-28 kDa (Fig.5).

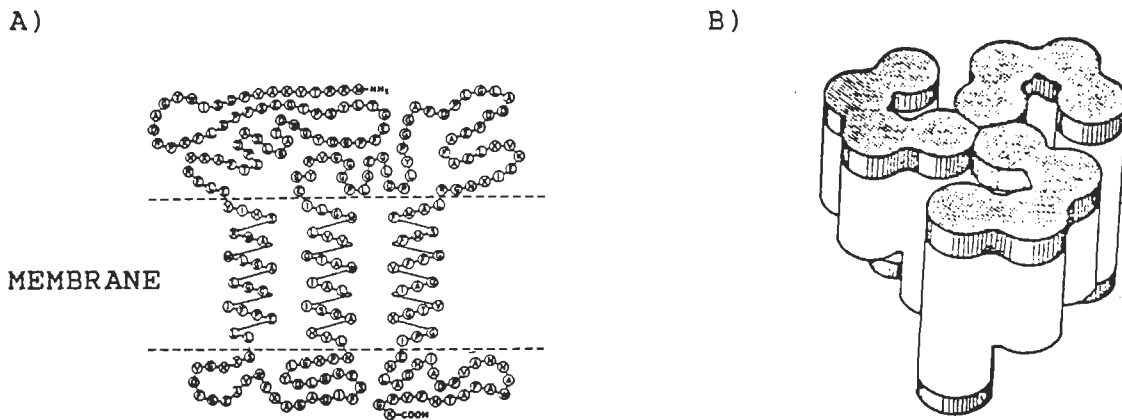


Fig.5 Modèle du complexe collecteur de lumière associé au Photosystème II (CCL-II) A) Structure tertiaire d'une sous-unité et B) Structure quaternaire (adapté de Thornber, 1986).

1.1.3 Séparation de charges et transport d'électrons dans les thylacoïdes

L'énergie d'excitation captée par les complexes chlorophylle-protéine est canalisée vers les centres réactionnels et transférée à un dimère de molécules de Chl, désignées respectivement P680 et P700 pour les centres réactionnels du PSII et PSI. Ces molécules spéciales de Chl sont localisées à l'extré-

mité du centre réactionnel la plus proche de la face interne de la membrane (Youvan et Marrs, 1987). Elles constituent des "pièges" pour l'énergie d'excitation puisque une des molécules du dimère de Chl sera excitée de telle sorte qu'elle cédera un électron situé dans une orbitale éloignée à une molécule voisine en l'espace de quelques picosecondes. Dans le centre réactionnel du PSII, cette molécule est une phéophytine, de composition et de structure analogue à la Chl, tandis que dans le centre réactionnel du PSI, la nature de cette molécule dénotée Ao n'est pas encore connue de façon sûre (Andréasson et Vanngard, 1988). Selon l'orientation des centres réactionnels dans la membrane, la séparation de charges entre P680 ou P700 et l'accepteur primaire s'effectue selon un axe perpendiculaire à la surface membranaire. Une telle séparation de charges crée une différence de potentiel électrique à l'intérieur de centre réactionnel (Ort, 1986). Cette réaction photochimique primaire est essentiellement une réaction d'oxydo-réduction, et constitue la première étape de l'emmagasinement de l'énergie sous forme chimique (Foyer, 1984). L'électron capté par l'accepteur primaire est rapidement transféré à un accepteur secondaire et ainsi de suite dans une chaîne vectorielle de transporteurs d'électrons. Chez les plantes et les algues supérieures, le transport d'électrons linéaire du PSII vers le PSI est le mécanisme principal, conduisant à la réduction du NADP^+ (Fig.6). Cette représentation diffère du schéma en Z classique puisqu'elle considère les trois complexes de transporteurs d'électrons

(PSII, PSI et le complexe cytochrome b/f) fonctionnant en série et reliés par un ensemble de transporteurs mobiles, les PQ et les plastocyanines (Ort, 1986). Un bref aperçu de ces différentes composantes est essentiel pour comprendre la dynamique générale entre les transporteurs d'électrons.

Après la séparation de charges dans le centre réactionnel du PSII et la réduction de la phéophytine, l'électron est transféré au premier accepteur stable, Q_A , puis à Q_B . La présence de P680 dans un état oxydé assure un potentiel rédox (0.85 V) suffisant pour tirer un électron du donneur primaire du PSII, Z. Cet oxydant acceptera un électron du complexe de dégagement d'oxygène, responsable de la photolyse de l'eau en oxygène et en protons (Govindjee et al, 1985; Ghanotakis et

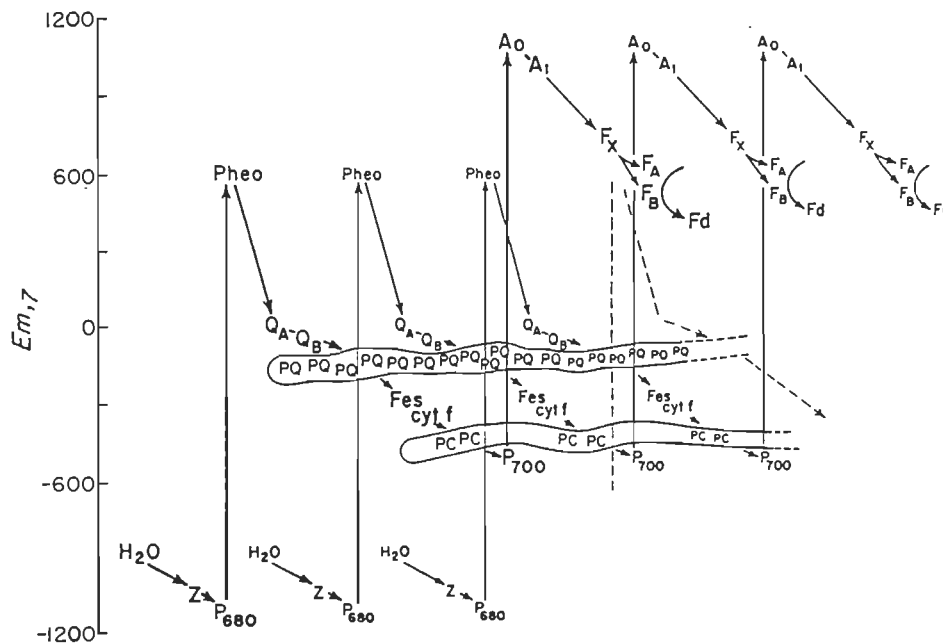


Fig.6 Version actuelle du schéma en "Z" décrivant la séquence et les potentiels d'oxydo-réduction au point milieu des différents transporteurs d'électrons dans les thylacoïdes.

Yocum, 1985). Lors de la réduction de Q_B par Q_A , deux protons sont prélevés de la phase aqueuse (stroma) causant la protonation complète de la molécule de plastoquinone (PQ) fixée au site Q_B . A ce moment, celle-ci se détache et diffuse dans la membrane. Le site Q_B accepte alors une nouvelle molécule de PQ disponible pour une autre double réduction et protonation (Chylla et Whitmarsh, 1987). Cette étape du transport photosynthétiques d'électrons est importante puisqu'elle permet de transférer les électrons générés à l'intérieur du complexe PSII jusqu'au bassin de molécules libres de PQ et autres transporteurs non-photochimiques entre les deux photosystèmes. .

Les molécules de plastoquinol (PQH_2) sont oxydées par le prochain intermédiaire, le complexe protéique b/f. Le modèle en vigueur actuellement propose la fixation et l'oxydation des PQH_2 par la protéine Fe-S de Rieske près de la surface interne de la membrane. Lors de cette oxydation, deux protons sont libérés dans le lumen du thylacoïde, contribuant ainsi à former le gradient transmembranaire (Ort, 1986). L'électron passe ensuite au cytochrome f, lequel cédera l'électron à une métalloprotéine extrinsèque, la plastocyanine (Haehnel, 1986). Celle-ci est située à la surface interne de la membrane, dans l'espace très limité du lumen (largeur estimée à 4 nm, Flores et al., 1983), et diffuse dans l'espace lumenal jusqu'au site de réduction du PSI. Il est remarquable que les diffusions latérales de la plastocyanine dans le lumen et de la plastoquinone dans la double-couche lipidique ne sont pas les

étapes limitantes du transport d'électrons dans les thylacoïdes. En effet, dans les conditions optimales d'activité photosynthétique, l'ensemble des PQ est principalement oxydé, tandis que celui des plastocyanines est surtout réduit (Whitmarsh, 1986).

Parallèlement aux réactions photochimiques du PSII et les réactions d'oxydo-réduction subséquentes, l'énergie d'excitation captée par le système pigmentaire associé au PSI provoque l'oxydation d'une molécule spécialisée de Chl (P700). L'électron libéré est capté par les accepteurs primaire (A₀) et secondaire (A₁). La nature de A₀ serait similaire à une molécule de Chl tandis que celle de A₁ serait vraisemblablement une vitamine K₁ (Andréasson et Vanngard, 1988). L'électron est ensuite transféré séquentiellement à trois protéines fer-soufre dénotées Fx, Fa et Fb, situées dans la membrane du thylacoïde. L'électron servira finalement à la réduction du NADP⁺, catalysée par l'enzyme membranaire extrinsèque NADP ferredoxine oxydo-réductase. Les protons sont pris du stroma afin de réduire le NADP⁺, réaction finale du transport non-cyclique d'électrons dans les thylacoïdes, allant de l'eau jusqu'au NADPH via les PSII et PSI (Hader et Tevini, 1987).

1.1.4 Photophosphorylation

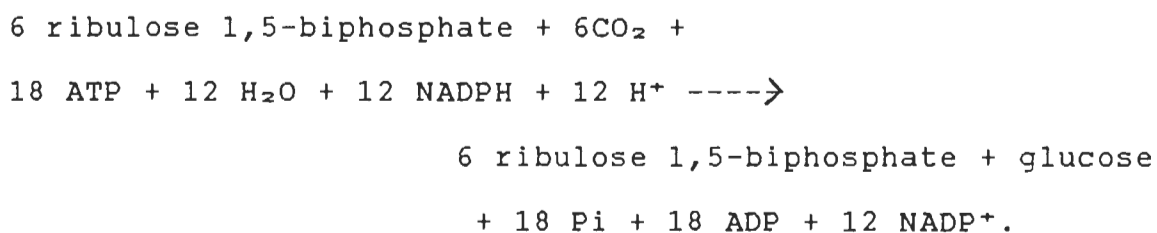
La photolyse de l'eau par le complexe de dégagement d'oxygène résulte en la libération de deux protons dans le lumen.

Aussi, la réduction des PQ lors du transport d'électrons dans les thylacoïdes contribue à augmenter la concentration des protons dans le lumen. Par ailleurs, la réduction du NADP^+ par la chaîne de transporteurs consomme les protons du stroma. Ces trois réactions contribuent à la formation d'un gradient de protons, où la différence de pH peut atteindre jusqu'à 4 unités (Hader et Tevini, 1987). Dans les thylacoïdes, le facteur de couplage ou l'ATPase permet de dissiper ce potentiel membranaire et d'utiliser l'énergie libérée (force protomotrice) pour synthétiser l'ATP. Le facteur de couplage est composé de deux sections, CF1 et CFo. La section catalysant la synthèse de l'ATP est hydrophyle et est visible par microscopie électronique à la surface des thylacoïdes. L'autre section, (CFo), est insérée dans la membrane, et sert à canaliser les protons à travers la membrane. La synthèse de l'ATP est initiée lors de la fixation d'un phosphate inorganique (PO_4^-) sur le CF1, qui réagit avec deux protons apportés le long de CFo. Un groupe métaphosphate (PO_3^-) instable est formé, qui réagit à son tour avec l'ADP pour produire l'ATP (Mitchell, 1974).

1.1.5 Assimilation du CO_2

L'énergie chimique emmagasinée dans les molécules d'ATP et de NADPH est stabilisée lors des réactions biochimiques de la photosynthèse. La première étape de la photoassimilation du CO_2 chez les plantes de type C3 est la fixation du CO_2 par

la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase dans un sucre à cinq carbones, le ribulose 1,5-diphosphate. Il en résulte la formation de deux molécules de 3-phosphoglycérate. Cette molécule à trois atomes de carbone (C3) est à la base d'un cycle métabolique complexe mise à jour par Calvin et ses collègues (Calvin et Bassham, 1962). Une façon utile de résumer ce cycle est d'écrire l'équation globale:



Pour les végétaux de type C4 (canne à sucre, maïs, etc.), la photoassimilation du CO₂ résulte à la formation d'oxaloacétate par la carboxylation du phosphoénolpyruvate. Cette étape est préliminaire à l'initiation du cycle de Calvin, et requiert une structure anatomique spécifique aux plantes C4, avec la présence des cellules périvasculaires (Bidwell, 1979; Lehninger, 1982). L'ensemble des réactions de fixation et de réduction du CO₂ chez les plantes C4 est plus exigeant au point de vue énergétique, mais l'efficacité photosynthétique est plus élevée que celle des plantes C3, qui sont défavorisées par les pertes photorespiratoires (Bidwell, 1979).

1.2 Aspects structurels et fonctionnels du photosystème II

La première partie de ce chapitre d'introduction visait à donner une vue d'ensemble des principales étapes de la photo-

synthèse. Dans cette deuxième partie, nous porterons notre attention, plus particulièrement, sur le complexe photochimique du PSII. Celui-ci est d'une importance capitale dans la photosynthèse puisqu'il est responsable de la photolyse de l'eau, source d'électrons à la base du transport d'électrons photosynthétiques dans les thylacoïdes. Par le fait même, le PSII est aussi responsable de la réduction de l'ensemble des molécules de PQ et enfin, de la distribution asymétrique des protons nécessaire à la photophosphorylation.

1.2.1 Composition et structure du PSII

Le complexe du PSII doit contenir tous les polypeptides nécessaires: 1) à l'absorption de la lumière, 2) à la séparation de charges entre la Chl spéciale P680 et la phéophytine, 3) à la photooxydation de l'eau et 4) au transport d'électrons subséquent. Les polypeptides constituant le complexe du PSII ont été déterminés biochimiquement à partir de fractions de membranes photosynthétiques enrichies en PSII et pratiquement dépourvues de PSI. Pour accomplir ses diverses fonctions, le PSII est composé de près d'une vingtaine de polypeptides différents, de deux PQ (Q_A et Q_B), d'un atome de fer, de deux molécules de Phéo, d'une ou deux molécules de cyt b-559, de 4 atomes de manganèse, ainsi que d'une quantité indéterminée d'atomes de chlore et de calcium (Ort, 1986). Quant aux différents pigments, il y aurait pour chaque PSII entre 300 et 400 molécules de Chl (Jursinic et Dennenberg,

1988; Melis et al., 1988) et 50 caroténoïdes (Ort, 1986).

Les différents transporteurs d'électrons sont distribués sur les cotés oxidant (où se trouve le complexe de dégagement d'oxygène) et réducteur (Q_A et Q_B), tels que définis par rapport au centre réactionnel. Ces transporteurs permettent de stabiliser l'énergie chimique libérée lors de la séparation de charges entre P680 et Phéo (Ort, 1986). La séquence et les temps de transfert d'électrons entre les différents transporteurs et la structure polypeptidique du PSII sont présentés à la Fig.7.

Après la séparation de charge dans le centre réactionnel du PSII, l'électron passe en 250 à 300 ps du côté réducteur du PSII de l'accepteur "transitoire" Phéo⁻ à Q_A . Ensuite, deux électrons sont successivement transférés de Q_A^- à une

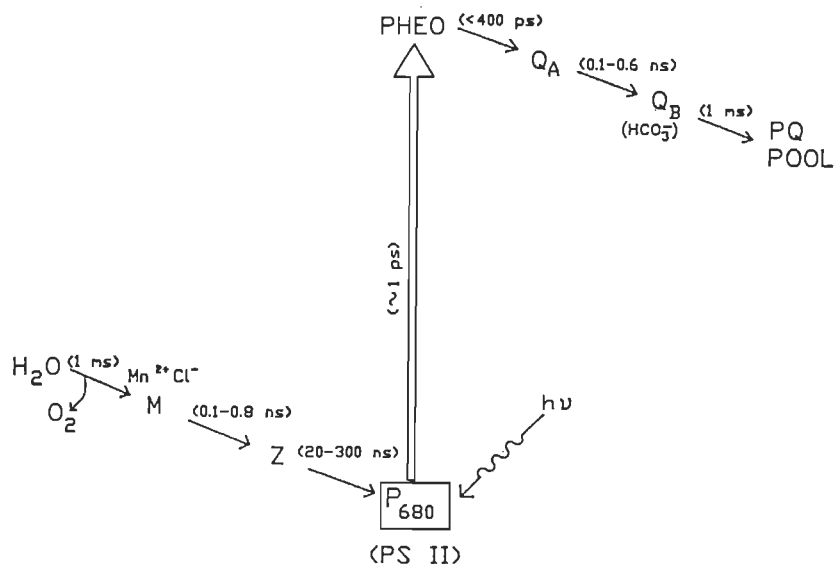


Fig.7 Séquence des transporteurs d'électrons impliqués dans les réactions d'oxido-réduction dans le complexe du photosystème II avec les temps de transfert d'électrons (tiré de Govindjee et al., 1985).

molécule de plastoquinone fixée au site Q_B dans l'ordre d'une centaine de ps. Cette réaction est facilitée par l'ion bicarbonate qui aurait deux sites d'interaction avec Q_B (Blubaugh et Govindjee, 1988), et cette même réaction est inhibée par l'herbicide DCMU (Tresbt, 1981). Après une ms, la molécule de plastoquinol (PQH_2) est libérée du site Q_B de la protéine 32 KDa pour être remplacée par une molécule de PQ oxydée.

En initiant le transport d'électrons sur le coté réducteur du PSII, $P680^+$ crée un potentiel redox suffisant pour oxyder l'eau au niveau du complexe de dégagement d'oxygène (CDO) sur le coté oxydant du PSII. $P680^+$ reçoit tout d'abord un électron du donneur primaire Z quelques centaines de ns après la séparation de charges primaire. Le donneur d'électron à $P680$, Z^+ , recevra à son tour un électron de l'eau en un peu moins d'une ns. La photolyse de l'eau est catalysée dans le CDO par les quatre atomes de manganèse localisés dans la protéine intrinsèque de 34 kDa. La libération d'une molécule d'oxygène à partir de deux molécules d'eau se produit après l'accumulation de quatre charges positives dans le CDO générées par la séparation de charges dans le centre réactionnel. Le site catalytique pour l'oxydation de l'eau dans le CDO évolue par quatre états d'oxydation successifs dénotés S_0 à S_4 , le numéro indiquant le nombre de charges positives accumulées dans le CDO. A l'état S_3 , l'accumulation d'une nouvelle charge entraîne la formation de l'état métastable S_4 qui se déactive spontanément en

libérant une molécule d'oxygène (Joliot et Kok, 1975).

Les composantes redox du PSII se retrouvent dans une structure protéique complexe (Fig.8). Le centre réactionnel est constitué par la protéine ayant le poids moléculaire le plus élevé du PSII (47 kDa). Celle-ci assure l'environnement nécessaire à la séparation primaire des charge de P680 jusqu'à la quinone Q_A , en passant par la phéophytine. L'autre grosse protéine (43 kDa) servirait à lier au centre réactionnel les polypeptides de 24, 26 et 28 kDa portant les pigments collecteurs de lumière et permettrait le transfert de l'énergie d'excitation des CCL-II à P680. La protéine de 32 kDa est celle où se fixe l'accepteur secondaire Q_B , une molécule du bassin des PQ tandis que l'autre protéine de poids voisin (34 kDa) contiendrait les atomes de manganèse impliqués dans l'oxydation séquentielle de l'eau (Govindjee *et al.*, 1985).

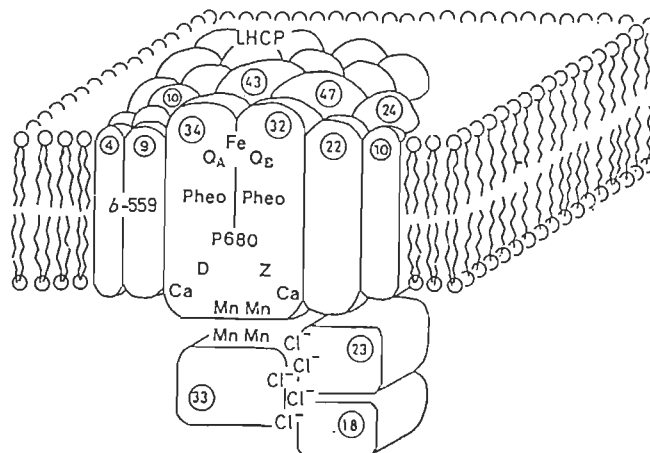


Fig.8 Structure du complexe PSII démontrant l'organisation entre les polypeptides et leurs composantes redox

Il existe aussi trois polypeptides extrinsèques (17, 23 et 33 kDa), ayant un rôle mal défini dans la photolyse de l'eau. Leur présence favorise grandement le dégagement d'oxygène, mais celui-ci peut être restauré en leur absence, du moins partiellement, par des concentrations appropriées de chlore et de calcium (Govindjee et al., 1985; Homann, 1987).

La structure minimale du PSII capable d'activité photochimique contient le cytochrome b-559 (cyt b-559), qui est intimement lié au centre réactionnel du PSII (Rolfe et Bendall, 1989; Nanba et Satoh, 1987). Widger et al. (1985) ont montré que le cyt b-559 est un oligomère impliquant deux polypeptides, de 9.2 et de 4.3 kDa. Le cyt b-559 se trouve sous deux formes pouvant être distinguées selon leur potentiel moyen d'oxido-réduction: le cyt b-559 HP ("High Potential") ayant un E_m situé entre +330 et +400 mV et le cyt 559 LP ("Low Potential"), d'un E_m de +50 à +100 mV à pH 7-8 (Bendall et Rolfe, 1987). Il existe une corrélation entre la quantité de cyt b-559 HP et la quantité de manganèse dans les thylacoïdes. Il existe une autre corrélation, reliant les cyt b-559 HP et la capacité de photooxydation de l'eau par le PSII (Horton et Croze, 1977). Ces deux corrélations seraient attribuées à un effet conformationnel du manganèse sur la structure des PSII (Bendall, 1982). Ainsi, plusieurs traitements modifiant la structure membranaire des thylacoïdes et inhibant l'activité du PSII diminuent par la même occasion la proportion de cyt b-559 HP (Cramer et Whitmarsh, 1977). Parmi ces traitements, mentionnons le traitement des thylacoïdes à la chaleur, aux

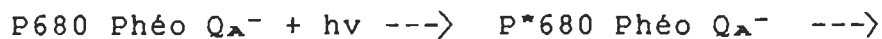
détergents, à l'hydroxylamine et à plusieurs protonophores. Plusieurs auteurs considèrent que ces effets sur le cyt b-559 sont le reflet d'un transport cyclique d'électrons autour du PSII (Heber et al., 1979; Arnon et Tang, 1988). Cependant, Maroc et Garnier (1979) ont affirmé que l'oxydation du cyt b-559 n'est que la conséquence de modifications structurales dans le thylacoïde. Supportant ce dernier point, Butler et Matsuda (1983) ont démontré que la présence de cyt b-559 HP est dépendante d'un environnement hydrophobique positivement chargé dans le thylacoïde.

Le ou les rôles du cyt b-559 dans le PSII demeurent encore aujourd'hui ce qui pourrait être la plus grande "énigme" du PSII (Ortega et al., 1989). L'idée la plus répandue actuellement est que le cyt b-559 serait impliqué dans un transport cyclique d'électrons autour du PSII lors de conditions défavorables (Bendall, 1982; Andréasson et Vanngard, 1988). Un tel transport cyclique serait un mécanisme de sécurité, prévenant les effets néfastes d'une intensité d'excitation trop intense et/ou d'une inhibition du transport d'électrons sur le côté oxydant du PSII (Heber et al., 1979). Dans ces conditions non-physiologiques, le cyt b-559 accepterait les électrons de Q_B et/ou des PQ (Arnon et Tang, 1988; Ortega et al., 1989). Il serait oxydé soit par le donneur primaire Z sur le côté oxydant du PSII (Falkowski et al., 1986; Homann, 1987) ou soit directement par le centre réactionnel (Heber et al., 1979; Butler et Matsuda, 1983). L'oxydation et la réduction d'un transporteurs d'électron par le même photosystème implique

nécessairement la présence d'un transport cyclique d'électron dans ce photosystème (Heber et al., 1979).

1.2.2 Emission de la fluorescence variable par le PSII

De façon générale, les molécules de Chl excitées après l'absorption de l'énergie lumineuse peuvent retourner à l'état fondamental soit: 1) par émission de fluorescence, 2) par dégagement thermique, ou 3) par transfert d'énergie aux molécules environnantes (Krause et Weis, 1984). Après la séparation de charge dans le centre réactionnel du PSII, la quinone Q_A est réduite et l'intensité de la fluorescence émise augmente. Cette fluorescence variable originant du environnantes (Krause et Weis, 1984). Après la séparation de charges dans le centre réactionnel du PSII, la quinone Q_A est réduite et l'intensité de la fluorescence émise augmente. Cette fluorescence variable originant du PSII, tel que proposé par Klimov et al. (1977), est considérée comme une luminescence de recombinaison selon les réactions suivantes:



Lorsque Q_A est réduit, il n'y a pas de transfert d'électrons et le complexe PSII est considéré comme "fermé". Dans ce cas, l'électron originant de la séparation primaire de charge ne peut être stabilisé et se recombine avec P680: l'énergie d'excitation est alors retournée aux pigments antennes et dissipée sous forme de fluorescence (Govindjee et Satoh, 1986). Lorsque Q_A est oxydé, il y a photochimie et la fluorescence est atténuée. Il existe donc une relation inverse entre la fluorescence et le taux de réduction de l'accepteur primaire du PSII, Q_A . Ainsi, l'intensité de la fluorescence augmente lorsque Q_A est réduit (Papageorgiou, 1975; Krause et Weis, 1984; Briantais *et al.*, 1986), et diminue lorsque le côté oxydant du PSII est inhibé (Butler, 1972).

Lorsqu'on illumine des plantes ou des algues adaptées à l'obscurité, il y a émission par le PSII d'une fluorescence dont l'intensité varie en fonction du temps selon des niveaux caractéristiques (effet Kautsky). La Fig.9 montre des courbes

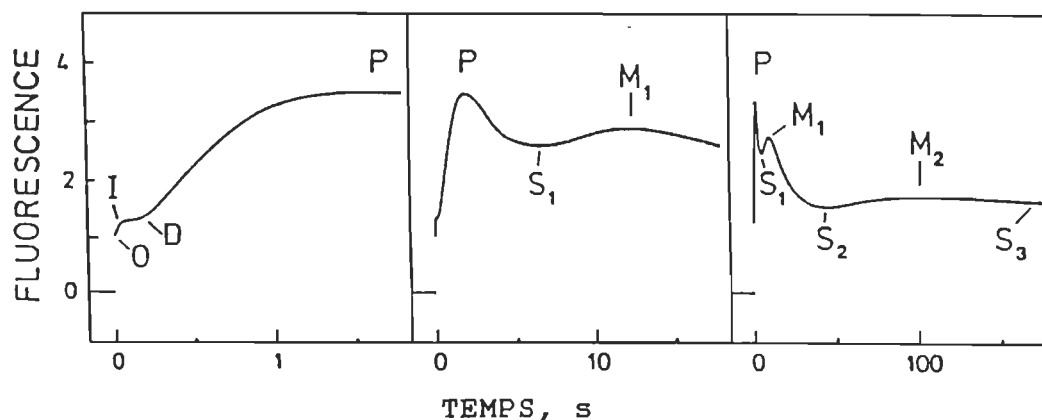


Fig.9 Courbes d'induction de fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps avec les niveaux de fluorescence O-I-D-P-S-M (tiré de Briantais *et al.*, 1986).

typiques d'induction de fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps. On peut distinguer les niveaux rapides O-I-D-P dans l'ordre d'une seconde et les niveaux lents S-M dans l'ordre de la minute.

Le niveau O (ou Fo) dénote la fluorescence "constante", observable lorsque tous les PSII sont "ouverts" (tous les Q_A oxydés): le taux de photochimie est alors maximal (Lavorel et al., 1986). Le niveau Fo est considéré constant puisqu'il est indépendant de la photochimie du PSII et serait attribuable à la perte d'excitation lors de la migration de l'énergie dans les antennes vers les centres réactionnels (Govindjee et Satoh, 1986). La fluorescence au-dessus de Fo est nommée fluorescence variable, et est dépendante de l'état redox de Q_A . La montée de fluorescence O-I indique la réduction rapide d'une fraction des Q_A par certains PSII tandis que l'inflection I-D est la conséquence de l'oxydation de Q_A^- par le PSI (Satoh et Katoh, 1981). En présence de l'herbicide DCMU, les niveaux I et D sont absents. Il y a donc une montée rapide de la fluorescence jusqu'à un niveau maximal et constant dénoté Fmax (Melis et Homann, 1975). Ensuite, la montée D-P reflète la réduction de tous les accepteurs d'électrons disponibles pour le PSII. Le niveau P est causé par un blocage temporaire du transport d'électrons lorsque les molécules de $NADP^+$ sont réduites au niveau du côté réducteur du PSI. Ensuite, la baisse de fluorescence entre P et S est causée principalement par la régénération du $NADP^+$ lors de la fixation du CO_2 (Govindjee et Satoh, 1986). Cette baisse

de fluorescence correspondant à la réoxydation de Q_A^- représente le "quenching" photochimique. L'autre cause de la baisse de la fluorescence impliquée dans la phase P-S est le "quenching" énergétique, dont la nature exacte est obscure mais qui est observé lors de la formation du gradient transmembranaire de protons dans les thylacoïdes (Krause et Weis, 1984; Horton et Hague, 1988). Enfin, les variations d'intensité de la fluorescence aux différents niveaux S et M seraient indépendants de l'état rédox de Q_A , mais dépendraient plutôt des changements structuraux dans les thylacoïdes et de la régulation des réactions enzymatiques du cycle de Calvin.

Une méthode rapide et fiable pour mesurer l'activité photochimique des PSII est l'aire complémentaire. L'aire complémentaire correspond géométriquement à la surface au-dessus de la courbe de fluorescence entre les niveaux O et P, délimitée par l'axe vertical au temps $t=0$ et par l'axe horizontal correspondant à l'intensité de fluorescence maximale (F_p ou F_{max}). L'aire complémentaire est proportionnelle à la quantité d'accepteurs d'électrons disponibles pour le PSII (Lavorel et al., 1986). Melis et Scheiber (1979) concluaient que l'aire complémentaire est un indicateur direct de la photochimie du PSII. Ainsi, l'aire complémentaire est une mesure indirecte de la capacité photochimique des PSII. Mentionnons que Malkin et al. (1981) ont obtenu une bonne corrélation entre la capacité photosynthétique (estimée par le taux de fixation du CO_2) et l'aire complémentaire, tandis que Samson et Popovic (1988) concluaient que l'aire complémen-

taire est un indicateur fiable de la phytotoxicité d'une vaste gamme de polluants. De plus, lorsque mesurée en présence de DCMU, l'aire complémentaire peut être utilisée pour estimer la quantité de PSII photochimiquement actifs. En effet, le bassin d'accepteur d'électrons disponibles au PSII est dans ces conditions limité à Q_A . Puisqu'il n'existe qu'un Q_A pour chaque complexe de PSII (voir section précédente), le bassin d'accepteurs d'électrons photoréduits correspond alors directement à la quantité de centres réactionnels actifs (Malkin et al., 1981).

Puisque la fluorescence variable origine en très grande majorité du PSII, celle-ci représente un outil important dans la recherche portant sur le transport d'électrons reliés au PSII. Par exemple, la fluorescence variable peut être utilisée pour analyser une portion de la chaîne des transporteurs d'électrons, et ainsi trouver le site d'action d'un inhibiteur (Hader et Tevini, 1987).

1.2.3 Hétérogénéités des PSII

Il est maintenant bien établi que les PSII dans les chloroplastes des algues vertes et des plantes supérieures ne sont pas homogènes tant au niveau structurel que fonctionnel. Ceci a été démontrée principalement par l'analyse de l'induction de la fluorescence (pour une revue sur le sujet, voir Balck et al., 1986). Tout d'abord, la nature biphasique de la cinétique de la fluorescence mesurée en présence de DCMU a

permis à Melis et Homann (1975) de proposer l'existence de deux types de PSII, les PSIIa et PSIIb. Il est maintenant admis que les PSIIa, responsables de la montée rapide de fluorescence, possèdent un large CCL et sont localisés dans les thylacoïdes granaires (Andréasson et al., 1988). Les PSIIb sont situés dans les thylacoïdes du stroma, possèdent une plus petite antenne et causent la montée lente de fluorescence (Melis et Homann, 1975; Owens, 1986; Andréasson et al., 1988). Il est important de noter que l'inefficacité relative des PSIIb n'est pas attribuable à un plus faible rendement photochimique mais uniquement à un plus faible taux d'énergie d'excitation canalisée par leurs petits complexes CCL vers les centres réactionnels (Thielen et van Gorkom, 1981).

L'autre aspect de l'hétérogénéité des PSII concerne les propriétés du côté réducteur au niveau de Q_A . Selon ces propriétés, deux populations de PSII, soit PSII de type Q_A et PSII de type non- Q_A , peuvent être définies selon leur habilité à réduire le bassin des molécules de PQ. Il semble que seulement les PSII de type Q_A peuvent réduire ces PQ à un taux physiologique, soit mille fois plus rapidement que les PSII de type non- Q_A (Lavergne, 1982; Graan et Ort, 1986; Chylla et Whitmarsh, 1987, 1989).

La relation entre ces deux aspects de l'hétérogénéité du PSII est loin d'être claire. Thielen et van Gorkom (1981) et Melis (1985) affirmaient que les PSIIb sont similaires au PSII de type non- Q_A . Cependant, Graan et Ort (1986) et Chylla et Whitmarsh (1987) suggéraient que les PSIIb étaient une sous-

population des PSII de type non-Q_B, tandis que Guenther et al. (1988) affirmaient le contraire. A travers ces divergences, Chylla et Whitmarsh (1987) reconnaissaient la possibilité que les PSIIb et les PSII de type non-Q_B soient deux populations indépendantes. Une idée actuellement répandue est que les PSIIb et les PSII de type non-Q_B constituent un même ensemble de PSII immatures, qui seront incorporés dans les thylacoïdes granaires lorsque leurs fonctions déficientes seront complétées (Melis, 1985; Andréasson et Vanngard, 1988).

1.2.4. Les transitions d'états

Un autre phénomène déterminant dans le transport d'électrons du PSII est les transitions d'états. Les CCL sont capables de distribuer l'énergie d'excitation absorbée entre les PSI et PSII selon les besoins énergétiques de ceux-ci. Ce phénomène de régulation appelé transition d'états ("state transitions") est nécessaire pour optimiser le transport d'électrons entre les deux photosystèmes (Fork et Satoh, 1986). Le mécanisme à la base de cette régulation est la phosphorylation par une kinase des CCL-II au niveau des peptides extrinsèques (revoir la structure des CCL-II à la Fig.5A). L'activation de l'enzyme kinase est déterminée par l'état redox des molécules de PQ. Suite à la phosphorylation des CCL-II, la présence du groupe phosphate à la surface des thylacoïdes granaires entraîne, par effet électrostatique, un désemplètement des grana. En conséquence, certains CCL-II sont

plus mobiles et peuvent diffuser latéralement vers les PSI dans les thylacoïdes du stroma (Hader et Tevini, 1987). Ce processus requiert une fluidité membranaire suffisante pour permettre la migration des CCL-II vers les PSI (Fork et al., 1979; Haworth, 1983). Lorsque les CCL-II sont près des PSI, l'énergie excessive préalablement absorbée par PSII est "déversée" en faveur du PSI. Ce phénomène se traduit par une baisse de la fluorescence émise par le PSII. De plus, ce mécanisme a un rôle de photoprotection puisqu'il diminue les risques de photooxydation du PSII causée par une trop grande énergie d'excitation (Fork et Satoh, 1986). Pour régulariser la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes, les transitions d'états doivent être réversibles. Lorsque les PQ sont oxydées par une trop forte activité

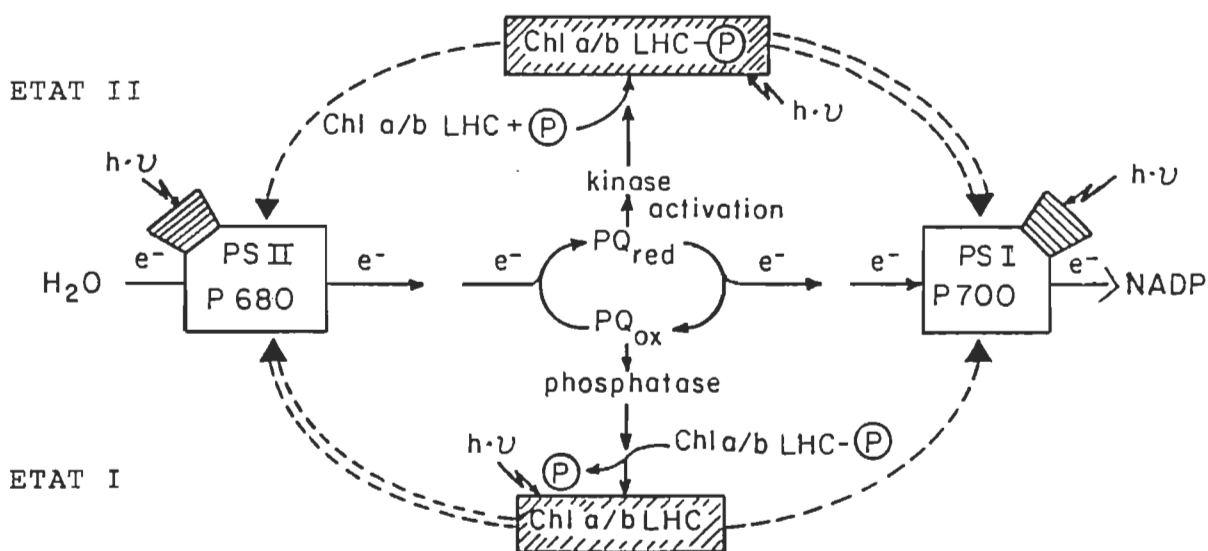


Fig. 10 Modèle résumant les différentes étapes du processus de régulation de l'énergie d'excitation par les transitions d'états dans les thylacoïdes (adapté de Hader et Tevini, 1987).

du PSI, la kinase est inhibée. Les CCL-II sont alors déphosphorylés par l'enzyme phosphatase. Les CCL-II retournent donc vers les PSII, causant la transition de l'état I à l'état II. Afin de résumer les différents mécanismes de régulation de l'énergie d'excitation, une représentation schématique du processus global est présenté à la Fig. 10.

1.3 Etat actuel de la recherche sur les effets inhibiteurs du mercure sur le transport d'électrons dans le PSII

Il est généralement admis que le principal site d'inhibition du mercure dans la chaîne de transporteurs d'électrons se situe spécifiquement au niveau du PSI, affectant la plastocyanine (Kimimura et Katoh, 1972; Yocum et Guikema, 1977; Hader et Tevini, 1987) et l'enzyme NADP-Ferredoxine oxydo-réductase (Honeycutt et Krogmann, 1972; De Filippis et al., 1981). Cependant, un examen de la littérature révèle que le PSII est aussi susceptible à la présence de mercure. Selon les auteurs, une grande diversité existe quant au mode et au site précis d'inhibition du mercure sur le PSII. Le transport d'électrons inhibé par le mercure chez des chloroplastes d'épinard était restauré par l'hydroxylamine. Cependant, un lavage des thylacoïdes avec une solution de sucrose-NaCl enlevait l'habilité de l'hydroxylamine à renverser l'effet inhibiteur de l'acétate phénylmercurique (Honeycutt et Krogmann, 1972). Cette sensibilité aux conditions expérimentales nous laisse supposer que l'effet du mercure n'est pas une

simple inhibition du complexe de dégagement d'oxygène. Par ailleurs, l'inhibition du transport d'électrons dans le PSII chez Euglena gracilis dans des conditions in vivo était renversée par l'addition du donneur d'électrons, le DPC, indiquant que le site d'inhibition se trouve près du complexe de dégagement d'oxygène (De Filippis et al., 1981). De plus, cette inhibition constituait le principal site dans la chaîne des transporteurs d'électrons (incluant les PSII et PSI). Ceci confirme l'importance de s'intéresser à l'effet inhibiteur du mercure sur l'activité du PSII.

En plus de l'effet inhibiteur du mercure sur le côté oxydant du PSII, un second effet du mercure a été rapporté au niveau du côté réducteur du PSII. Radmer et Kok (1975) ont analysé le pattern des oscillations du dégagement d'oxygène produit par éclairs brefs chez des chloroplastes d'épinard. L'intensité des pics d'émission d'oxygène était fortement inhibée par le mercure après le cinquième éclair, mais était restaurée par la présence de l'accepteur d'électrons FeCN. Ces résultats indiqueraient un blocage des électrons au niveau du côté réducteur du PSII. Il est à noter qu'un examen plus poussé de leurs résultats montre une inhibition d'environ 30% de l'intensité du pic au troisième éclair, indiquant la présence de l'autre site d'inhibition au côté oxydant du PSII tel discuté plus haut. D'autres résultats obtenus récemment viennent supporter la possibilité d'un blocage des électrons par le mercure au niveau du côté réducteur du PSII. Hsu et Lee (1988) montraient que le mercure et le cuivre inhibent dans

une même proportion le taux de photoréduction du DCPIP. Cependant, le mercure diminue faiblement l'intensité de la fluorescence par rapport au cuivre. Ceci suggère que l'effet du mercure sur la photoréduction du DCPIP résulterait en partie d'une inhibition du côté réducteur du PSII par le mercure.

Enfin, un troisième type d'interaction du mercure avec le transport d'électrons dans le PSII aurait été identifié par Miles et al. (1973). Ces auteurs ont observé que le HgCl_2 inhibait la photoréduction du DCPIP, du FeCN et du MV mais n'affectait pas le dégagement d'oxygène supporté par le DCPIP et le FeCN. De plus, le mercure atténuait l'intensité de la fluorescence en présence et en absence de DCMU. Par ces résultats, les auteurs concluaient que le mercure accepterait les électrons de Q_A^- . Cependant, un tel effet du mercure n'a jamais été reconsidéré dans les travaux subséquents.

1.4 Etat actuel de la recherche sur les effets inhibiteurs du cuivre sur le transport d'électrons dans le PSII

Durant les vingt dernières années, plusieurs auteurs ont étudié les effets inhibiteurs du cuivre sur le transport d'électrons dans les chloroplastes. Il apparaît clair que le principal site d'inhibition du cuivre dans la chaîne de transporteurs d'électrons se situe au niveau du PSII. Un deuxième site d'inhibition a aussi été identifié au niveau de la ferredoxine oxido-réductase, sur le côté réductant du PSI,

mais à des concentrations généralement supérieures à celles requises pour inhiber la majeure partie de l'activité du PSII (Cedeno-Maldonado et al., 1972; Shioi et al., 1978; Samuelsson et Oquist, 1980). Mentionnons que le complexe cytochrome b-f serait aussi sensible à la présence de cuivre chez la cyanobactérie Anacystis nidulans (Singh et Singh, 1987). L'importance relative entre les sites d'inhibition varie selon le matériel photosynthétique et/ou les méthodes utilisées et/ou les auteurs. Ainsi, aucune affirmation a priori ne peut être faite quant au principal site d'inhibition du cuivre dans la chaîne des transporteurs d'électrons.

Les résultats expérimentaux concernant spécifiquement l'inhibition de l'activité du PSII par le cuivre montrent que le principal site d'inhibition se trouve du côté oxydant après le site de donation d'électrons du DPC (Cedeno-Maldonado, 1972; Shioi et al, 1978), et après le site d'inhibition de l'acide linoléique (Hsu et Lee, 1988). Ces résultats indiquent que le site principal d'inhibition du cuivre se trouve près de P680. Cette conclusion est confirmée par Rengenathan et Bose (1989), qui ont observé que le cuivre diminuait l'intensité de la fluorescence chez des centre réactionnels de PSII isolés et purifiés, dépourvus de Q_A, de Q_B et de PQ. Par contre, d'autres auteurs ont affirmé que le complexe de dégagement d'oxygène était le site d'action du cuivre (Vierke et Struckmeier, 1978; Bohner et al., 1980).

La présence d'un seul site d'inhibition spécifique au cuivre et bien défini au niveau du centre réactionnel du PSII

reste difficile à accepter puisque a) l'inhibition de l'activité du PSII par l'effet du cuivre est partiellement renversée par le DPC (Cedeno-Malnodano et al., 1972; Shioi et al., 1978), b) l'addition du manganèse renverse partiellement sous certaines conditions l'inhibition du PSII par le cuivre (Habermann, 1969; Samuelsson et Oquist, 1980; Rengenathan et Bose, 1989) et c) la baisse de fluorescence émise par le PSII causée par le cuivre est partiellement renversée par le DCMU (Shioi et al., 1978; Hsu et Lee, 1988). En rapport avec ce dernier point, Mohanty et al. (1989) ont récemment observé par les méthodes de thermoluminescence et de fluorescence retardée un effet inhibiteur beaucoup plus fort en absence de DCMU qu'en présence de DCMU. Toutes ces différentes observations suggèrent la présence d'autres sites d'inhibition du cuivre sur le transport linéaire d'électrons dans le PSII, soit sur le coté oxydant du PSII ou au niveau de Q_B .

Vierke et Struckmeier (1977,1978) ont démontré que l'effet inhibiteur du cuivre sur l'activité du PSII résulte de la fixation de l'ion Cu^{2+} sur un résidu non-protoné d'une protéine située près du complexe de dégagement d'oxygène. Cette protéine ne serait pas directement impliquée dans le transport d'électrons, mais des changements de conformation à l'intérieur de la membrane subséquents à la fixation du cuivre entraîneraient une inhibition du transport d'électrons. En s'appuyant sur cette conclusion, Mohanty et al. (1989) suggéreraient que le cuivre causerait des modifications structurales au site Q_B entraînant une perte d'activité des PSII et une

baisse de la fluorescence variable.

En plus de la caractérisation du ou des sites d'action du cuivre, le type d'inhibition du PSII par le cuivre reste à être déterminé. Récemment, Hsu et Lee (1988) suggéraient, à partir de la relative insensibilité de la montée O-I de la fluorescence, que l'inhibition du PSII par le cuivre était de type tout-ou-rien, c'est-à-dire que le cuivre bloque l'activité d'une fraction des PSII sans affecter les autres PSII. Cependant, cette montée de fluorescence reflète la réduction rapide des Q_A par les PSII avant l'action des PSI (Govindjee et Satoh, 1986). Donc, si une certaine proportion de PSII était totalement inactivée par le cuivre, ceci devrait se traduire par une baisse équivalente de la fluorescence au niveau I.

1.5 Importance et objectifs de la recherche

La présence de cuivre et de mercure dans l'environnement constitue une grande menace écologique. Ces métaux lourds peuvent entraîner une inhibition de la croissance du phytoplancton, le premier maillon de la chaîne alimentaire aquatique, et ainsi réduire la production de biomasse aux niveaux trophiques supérieurs (Barnes, 1980). Il a été proposé que la photosynthèse est le premier processus physiologique affecté par ces inhibiteurs (Overnell, 1976). Il n'est donc pas surprenant de constater que ces deux métaux lourds soient les plus toxiques autant pour la croissance du phytoplancton (Chiaudani et

Vighi, 1978; Kessler, 1986) que pour le transport d'électrons photosynthétiques dans les membranes des chloroplastes, notamment au niveau du PSII (Hsu et Lee, 1988).

Les métaux lourds, dont le cuivre et le mercure, ont déjà été présentés en tant qu'inhibiteurs spécifiques du transport d'électrons photosynthétiques dans les thylacoïdes (Trebst, 1981). Dans l'optique de cet auteur, leur utilisation serait un outil servant à l'étude de la séquence et des mécanismes détaillés du transport d'électrons dans les PSII. Cependant, considérant les ambiguïtés présentées aux sections 1.3 et 1.4, une telle utilisation de ces métaux lourds demande avant tout une meilleure compréhension des effets inhibiteurs sur le PSII.

De plus, l'intérêt de cette étude ne se limite pas aux métaux lourds, mais pourrait s'étendre à d'autres situations limitantes où le transport d'électrons dans le PSII est inhibé. En effet, les végétaux sont soumis dans leur milieu naturel à divers stress environnementaux qui, en plus des métaux lourds, affectent le côté oxydant du PSII: mentionnons par exemple le stress hydrique (Wiltens et al., 1978; Canaani et al., 1986), les basses températures (Margulies 1972; Kaniuga et al., 1978) et les fortes intensités lumineuses (Powles, 1984). Ainsi, l'étude du transport d'électrons dans les PSII inhibés par le cuivre et le mercure à des sites d'inhibition apparamment différents, pourrait nous renseigner sur l'existence d'un ou plusieurs mécanismes alternatifs de transport d'électrons dans les PSII.

L'état actuel des recherches sur les effets inhibiteurs du cuivre et du mercure dans le PSII montre que plusieurs questions demeurent sans réponse et que certains points restent à éclaircir. Dans ce contexte, les 4 principaux objectifs de cette recherche sont les suivants.

A- Caractériser le site et le mode d'action du mercure et du cuivre sur le transport d'électrons dans le PSII.

Il est généralement admis que le cuivre agit quelque part au niveau du centre réactionnel du PSII. Cependant, Vierke et Struckmeier (1978) ainsi que Bohner et al. (1980) situaient l'effet inhibiteur du cuivre au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. La même confusion existe pour le mercure dont l'inhibition peut être renversée ou non par l'hydroxylamine selon les conditions expérimentales (Honeycutt et Krogmann, 1972). Il est donc important de localiser les sites d'inhibition de ces métaux lourds au niveau du PSII pour nos conditions expérimentales afin de mieux comprendre les modifications observées sur le transport d'électrons dans le PSII.

De plus, les modes d'action du cuivre et du mercure sur l'activité du PSII ne sont pas encore bien compris. Dans ma recherche, il s'agira tout d'abord de démontrer si ces métaux lourds inhibent complètement une quantité croissante de PSII ou si tous les PSII sont graduellement inhibés par le cuivre ou le mercure. Par le fait même, il sera possible de dire s'il existe différentes sensibilités entre certaines populations de PSII vis-à-vis les effets inhibiteurs de ces métaux

lourds.

B- Etudier les hétérogénéités fonctionnelles des PSII par l'effet inhibiteur du mercure

La comparaison des sensibilités spécifiques de PSIIb et de PSII de type non-Q_B en fonction de la concentration de mercure permettra d'estimer le degré de relation entre ces deux populations. Pour ce qui est du cuivre, Renganathase et Bose (1989) suggéraient que celui-ci affectait seulement une fraction des PSII a et/ou de type Q_B. Cependant, par le comportement de l'ion cuivrique en solution (Cotton et Wilkinson, 1988), il est possible que la précipitation du cuivre à des concentrations de quelques dizaines de micromolaire soit un artéfact important invalidant une part de leurs résultats (voir section 3.6).

C- Démontrer les interactions du mercure et du cuivre sur le cytochrome b-559

Le rôle du cytochrome b-559 dans l'activité du PSII est encore aujourd'hui très énigmatique (Ortega et al., 1989). Cependant, plusieurs traitements affectant le PSII transforment une partie du cyt b-559 HP en cyt b-559 LP, ce qui s'accompagne d'une perte d'activité du PSII. La caractérisation redox du cyt b-559 et les mesures de photoréduction du cyt b-559 en présence de cuivre et de mercure nous indiqueront le type d'interaction possible entre ces métaux et le cyt-559.

Par conséquent, il sera possible d'apporter une contribution significative dans la compréhension de la nature des modifications induites par le cuivre et le mercure sur le transport d'électrons du PSII. Par exemple, je tenterai d'identifier la présence de transport cyclique autour du centre réactionnel ou de déduire un changement conformationnel de la structure du PSII.

D- Démontrer l'inactivation des transitions d'états suite à l'inhibition du PSII par le cuivre

L'illumination des thylacoïdes en absence d'accepteur d'électrons entraîne la réduction des PQ et la stimulation de l'activité de la kinase. L'addition d'ATP à une telle suspension de thylacoïdes permet la phosphorylation des CCL associés au PSII et leur migration vers le PSI. Cette migration des CCL-II entraîne une baisse d'activité du PSII, observable par une baisse de la fluorescence variable (Horton et Black, 1982; Fork et Satoh, 1986). En présence de cuivre, dont le principal site d'action dans la chaîne des transporteurs d'électrons se trouve au niveau de PSII, la capacité de ces derniers à réduire l'ensemble des molécules de PQ devrait être grandement diminuée. Quant au mercure, son effet marqué au niveau de la plastocyanine tel qu'observé dans des conditions in vitro (Kimimura et Katoh, 1972, Trebst, 1981) risque de modifier le transport d'électrons entre les deux photosystèmes et ainsi affecter les transitions d'états. Dans ce contexte, je chercherai à démontrer les interactions

entre l'inhibition du PSII par le cuivre et les mécanismes de régulation de la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes.

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Culture et préparation des algues

Les algues du genre Dunaliella sont des algues microscopiques, unicellulaires, faisant partie de l'ordre des Volvocales, division Chlorophyta. Les cellules contiennent un seul chloroplaste occupant environ 50% du volume cellulaire. Leur principale caractéristique qui les distingue des autres Volvocales est l'absence d'une paroi cellulaire cellulosique rigide. La cellule est séparée du milieu externe que par une membrane plasmique (Ben-Amotz, 1980; Aoki et al., 1986). Par ses caractéristiques, D.tertiolecta est donc idéale pour étudier in vivo les effets du cuivre et du mercure sur les propriétés du transport d'électrons dans les PSII.

Les algues utilisées proviennent de la "North East Pacific Culture Collection" de l'université de la Colombie-Britannique à Vancouver. Elles ont été cultivées dans le milieu de culture élaboré par Harrison et al. (1980), contenant les sels, les micro-éléments et les vitamines nécessaires à la croissance des algues. Une seule modification a été apportée au milieu original, soit l'addition de 10 mM du tampon HEPES pour maintenir le pH à près de 7.5 au cours de la culture. La température de croissance était maintenue à 18°C. L'illumination continue d'une intensité d'environ 10 mW/m² était

assurée par des tubes fluorescents de marque "Gro and Sho" de General Electric.

Lors des expériences, les cultures étaient récoltées après 4 jours de croissance par une centrifugation à 3000Xg pendant 2 minutes. Ensuite, les algues étaient lavées deux fois avec du milieu de culture frais, mais où les microéléments et les vitamines étaient absents afin d'éviter des interactions chimiques (chélation, complexation) avec le cuivre ou le mercure. Les algues étaient finalement resuspendues dans le milieu modifié à une concentration précise de Chl totale, déterminée dans l'acétone 80% selon la méthode décrite par Strain et al. (1972). Pour les traitements avec le cuivre ou le mercure, les algues étaient adaptées à l'obscurité pendant 30 minutes, puis incubées toujours à l'obscurité en présence de différentes concentrations de cuivre ou de mercure.

2.1.2 Culture des plantules d'orge et préparation des thylacoïdes

L'orge utilisée provient d'un producteur local de semence (St-Grégoire, Qc). Après stérilisation superficielle des graines avec du peroxyde d'hydrogène 3% pendant 15 min, celles-ci étaient semées dans des bacs de vermiculite. L'illumination était fournie par des lampes au sodium à haute pression et la température était de 22-24°C. Les plantules étaient arrosées quotidiennement avec l'eau du robinet sans apport nutritif autre que les réserves endogènes des graines.

Dans ces conditions facilement reproductibles, les plants d'orge étaient récoltés après 8 jours de croissance pour l'isolation des fragments de thylacoïdes.

Les principes de la méthode d'isolation des thylacoïdes sont ceux décrits par Walker (1971) et les solutions sont celles utilisées par Deng et Melis (1986), exception faite du milieu de resuspension utilisé lors des expériences. Premièrement, la partie supérieure (partie déroulée) des feuilles (100 g) est coupée plus ou moins finement puis mélangée à 250 ml de la solution de broyage à 0°C, dont la composition est donnée au Tableau 1. Les segments de feuilles sont broyés à la vitesse maximale pendant 15 secondes dans un broyeur domestique muni de lames additionnelles. La suspension résultante est filtrée dans un filtre dont le diamètre des pores est de 1mm afin d'éliminer les débris de feuilles, et filtrée à nouveau à l'aide d'un filtre ayant des pores de 25 μ m. Le filtrat, qui contient les chloroplastes et les autres organelles du cytoplasme, est centrifugé à 3000Xg pendant 5 minutes pour isoler les chloroplastes. Ceux-ci sont ensuite resuspendus dans environ 10 fois leur volume dans un milieu hypotonique, afin de briser par un choc osmotique l'enveloppe des chloroplastes et ainsi libérer le stroma et les fragments de thylacoïdes. Une dernière centrifugation à 5000Xg pendant 5 minutes permet de récupérer les fragments de thylacoïdes, qui sont resuspendus dans un volume minimal de solution de conservation. Les thylacoïdes étaient congelés tel quel à -130°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 1. Composition chimique des solutions utilisées pour l'extraction, la conservation et la resuspension des fragments de thylacoïdes.

A <u>Milieu de broyage:</u>	Tricine-NaOH (pH 7.8) -----	50 mM
	Sucrose -----	400 mM
	NaCl -----	10 mM
	MgCl ₂ -----	5 mM
B <u>Milieu de lavage:</u>	Tricine-NaOH (pH 7.8) -----	20 mM
	NaCl -----	10 mM
	MgCl ₂ -----	5 mM
C <u>Milieu de conservation:</u>	HEPES-NaOH (pH 7.8) -----	20 mM
	Sucrose -----	400 mM
	NaCl -----	10 mM
	Ethylène-glycol -----	30% (v/v)
D <u>Milieu de resuspension:</u>	HEPES-NaOH (pH 7.5) -----	20 mM
	Sucrose -----	100 mM
	NaCl -----	10 mM
	MgCl ₂ -----	5 mM

Pour les traitements avec le cuivre ou le mercure, les thylacoïdes étaient resuspendus dans une solution de resuspen-

sion (voir Tableau I) à une concentration désirée en Chl (voir conditions expérimentales, sections 2.2.1 et 2.2.2). Les thylacoïdes étaient ensuite incubés pendant 15 minutes à 20°C en présence de différentes concentrations de cuivre ou de mercure. Pour la solution de resuspension, les modifications par rapport à celle de Deng et Melis (tampon HEPES à pH 7.5 au lieu de Tricine pH 7.9) s'expliquent par l'absence d'interaction de l'HEPES avec les métaux lourds dont le cuivre (Rengenathan et Bose, 1989) et le pH moins alcalin limitant les interactions du cuivre avec les ions hydroxyls (Cotton et Wilkinson, 1988).

2.2 Méthodes analytiques

Dans ce travail, trois principales méthodes d'analyse ont été utilisées: la polarographie, la fluorospectroscopie et la spectrophotométrie. Les principes de base de ces méthodes sont ici présentés en relation avec le transport d'électrons reliés au PSII.

2.2.1 Dégagement d'oxygène mesuré par polarographie

L'oxygène est libéré lors de la photolyse de l'eau au niveau du complexe de dégagement d'oxygène suite au transport d'électrons amorcé dans le PSII (section 1.2.1). Ainsi, la détermination du taux de dégagement d'oxygène est une indication du taux de transport d'électrons dans les thylacoïdes. Le

système pour mesurer l'oxygène produit est une électrode de type Clark (Yellow Spring Instr.) constituée d'une anode en argent et d'une cathode en platine reliées par un pont d'électrolytes (KCl). Ce système est séparé du milieu de réaction contenant le matériel photosynthétique par une membrane perméable à l'oxygène. Lorsqu'un voltage suffisant (600-700 mV) est appliqué sur l'électrode, l'électrode polarisée réduit l'oxygène à la surface du platine en formant du peroxyde d'hydrogène. Les électrons perdus par le platine tendent à dissiper la différence de potentiel (voltage) entre l'anode et la cathode lorsque les électrons sont donnés à l'oxygène. Le courant électrique qui en découle est donc directement relié à l'oxygène consommé au niveau de la cathode. Si la solution de réaction est agitée convenablement, ce courant (acheminé à un amplificateur relié à un enregistreur) est directement proportionnel à la concentration de l'O₂ en solution (Delieu et Walker, 1972). La calibration du système est possible par l'addition de quelques cristaux de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄) dans le milieu de réaction, qui réagit rapidement pour éliminer complètement l'oxygène présent dans le milieu. La différence de signal enregistré correspond à la concentration de l'oxygène dans l'eau saturée.

Le dégagement d'oxygène a donc été mesuré avec les algues intactes et les thylacoïdes pour déterminer le degré d'inhibition de l'activité du PSII. La concentration en Chl totale pour les algues et les thylacoïdes était de 20 ug Chl totale/ml. Pour les algues resuspendues dans leur milieu de

culture modifié et incubées en absence ou en présence de mercure ou de cuivre, aucun accepteur artificiel d'électrons n'a été ajouté. Cependant, pour le dégagement d'oxygène produit par les thylacoïdes (qui sont dépourvus d'accepteurs d'électrons terminaux), la para-benzoquinone, p-BQ (1 mM), était ajoutée dans le milieu de réaction. En l'absence de ADP et de l'ion phosphate, la photophosphorylation est inhibée et l'accumulation des protons dans le lumen ralentit l'activité du complexe de dégagement d'oxygène. Pour obtenir le taux maximal de transport d'électrons, le découpleur NH_4Cl (1 mM) a été ajouté juste avant l'illumination pour empêcher la formation d'un gradient de protons dans les thylacoïdes (Popovic et al., 1984).

2.2.2 Mesure et analyse de la fluorescence

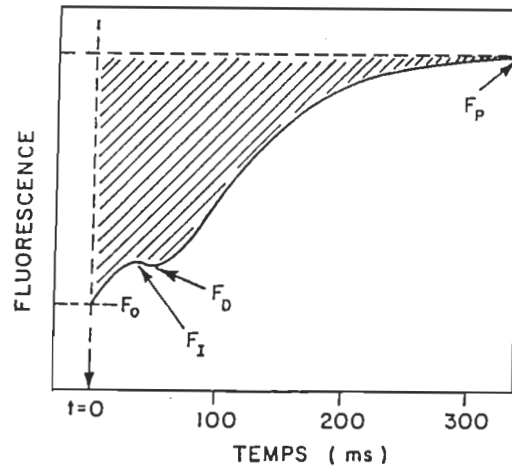
A) Fluorescence à la température de la pièce

L'analyse de l'induction de la fluorescence variable est un outil puissant pour étudier les phénomènes de transport d'électrons dans les thylacoïdes (Papageorgiou, 1975; Krause et Weis, 1984; Govindjee et Satoh, 1986; voir aussi section 1.2.2). Les courbes d'induction de fluorescence émises par les algues ou les thylacoïdes ont été mesurées à l'aide d'un fluorimètre à sphère intégrante (Morissette et al., 1988). Les échantillons adaptés à l'obscurité étaient illuminés avec une lumière verte (475 à 550 nm) produite par la combinaison des

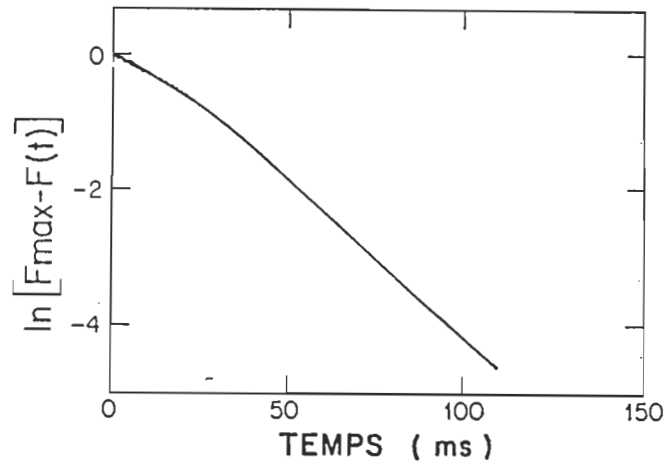
filtres CS 4-96 et CS 3-71, et ayant une intensité d'environ 3.5 W/m^2 . Selon van Gorkom (1986), une excitation plus homogène des thylacoïdes est obtenue avec une lumière verte comparativement à une lumière bleue. Ensuite, à l'aide des filtres Corning CS-2-64 et CS-7-59 placés devant un détecteur optique Devar 539-01-5, le signal isolé de la fluorescence émise était mesuré, pré-amplifié puis acheminé à un oscilloscope analogue digital (Northwest Instr. Syst. Scope-85). Les données numériques étaient alors enregistrées sur disquette à l'aide d'un Apple-IIe, pour une analyse numérique subséquente.

L'intensité de la fluorescence mesurée est composée des fluorescences constante et variable. Pour distinguer ces deux parties, le niveau F_0 a été évalué selon la méthode de Morissette et Popovic (1987), par l'extrapolation de la courbe de fluorescence mesurée sur les premières 20 ms jusqu'à l'ordonnée. Grâce à un logiciel d'analyse (Morissette, comm. personnelle), l'aire complémentaire (voir section 1.2.2) a été évaluée par l'intégration de $\int F_{\text{max}} - F(t) dt$ entre le temps zéro et le temps requis pour atteindre le niveau F_p (Malkin et al., 1981) (Fig.11A). Le taux de photoréduction de l'accepteur primaire Q_A a été estimé par la pente "K" de la partie linéaire de la courbe définie par le $\ln [F_{\text{max}} - F(t)]$ en fonction du temps (Manodori et Melis, 1986) (Fig.11B). La proportion des PSIIb a été évaluée selon la méthode de Melis et Homann (1975), à partir des courbes d'induction de fluorescence émises par des algues traitées avec le DCMU. L'analyse semilogarithmique de l'accroissement de l'aire complémentaire en

A)



B)



C)

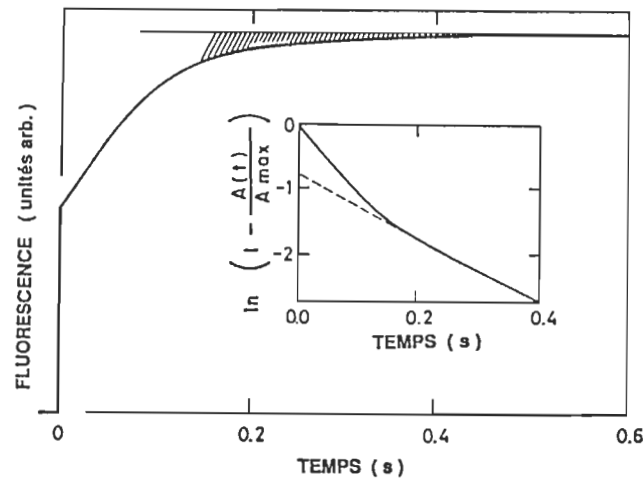


Fig.11 Analyse des principaux paramètres de fluorescence. A) L'aire complémentaire calculée par $\int [F_{\max} - F(t)] dt$, B) le taux de photoréduction de Q_A estimé par la pente du $\ln [F_{\max} - F(t)]$ et C) analyse semilogarithmique de l'accroissement de l'aire complémentaire à partir d'une courbe typique d'induction de fluorescence en présence de DCMU.

fonction du temps montre deux phases distinctes, une rapide et une lente. L'extrapolation de la phase lente jusqu'à l'ordonnée (temps = 0) donne la proportion des PSIIb contribuant à la photochimie totale des PSII (Voir Fig.11C).

Quant à la proportion des PSII de type non-Q_B, elle sera déterminée par le rapport Fv^{01}/Fv , où Fv^{01} représente l'intensité de la fluorescence entre les niveaux 0 et I, et Fv représente l'intensité de la fluorescence variable totale, soit la différence entre l'intensité maximale de fluorescence au niveau F_p et la fluorescence constante F_o (Cahen et al., 1976; Butko et Szalay, 1985; Guenther et al., 1988).

B) Fluorescence à basse température (77 °K)

Les spectres d'émission de fluorescence à basse température (77°K) sont utilisés pour distinguer les changements dans la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (Krause et Behrend, 1983; Mawson et Cummins, 1986). La figure 12 présente un spectre typique d'émission de fluorescence obtenu à 77°K, caractérisé par trois bandes majeures à 685, 695 et 735 nm. Ces bandes correspondent respectivement à l'émission de fluorescence originant du CCL-II, aux Chl du centre réactionnel du PSII et à celles du centre réactionnel du PSI (Krause et Weis, 1984; Briantais et al., 1986). Les spectres d'émission de fluorescence à 77°K ont été mesurés à l'aide d'un spectrofluorimètre SPEX Datamate DM1. Un volume 200 µl d'une suspension de thylacoïdes à 7 µg

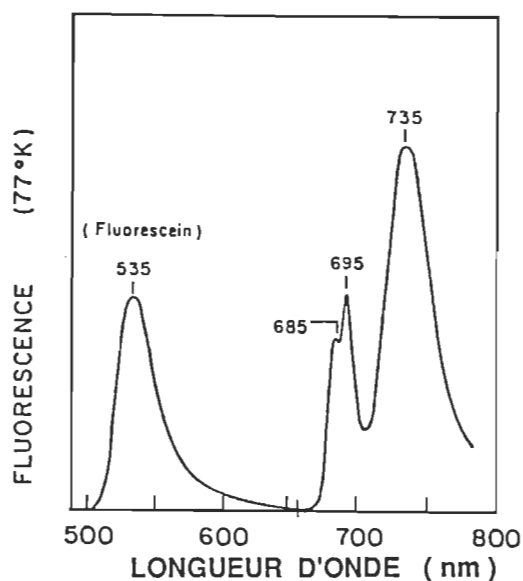


Fig.12 Spectre caractéristique d'émission de fluorescence mesuré à 77°K chez des thylacoïdes.

Chl/ml placées entre deux lamelles de verre était immergé dans l'azote liquide puis illuminé à 450 nm. La fluorescence était mesurée entre 650 et 750 nm. Les rapports des pics de fluorescence à 735/695 indique la proportion de l'énergie d'excitation présentes dans le PSI par rapport au PSII.

2.2.3 Spectrophotométrie par différences d'absorbance

Le taux de réduction et l'état d'oxydo-réduction du cyt b-559, ainsi que le changement électrochromique C-550 associé à la photochimie du PSII ont été mesurés avec un spectrophotomètre Aminco DW-2000 en mode "Dual". Dans ce mode d'opération, deux faisceaux monochromatiques modulés sont passés dans une même cuvette contenant la suspension de thylacoïdes. Après l'absorption des faisceaux par l'échantillon, le signal résul-

tant au niveau d'un tube photomultiplicateur était résolu en ses deux composantes. La différence d'absorbance entre ces celles-ci était finalement mesurée (anonyme, 1987).

La forme réduite du cyt b-559 montre un pic d'absorption caractéristique à 559 nm (Bendall, 1982; Bendall et Rolfe, 1987). La différence d'absorbance à cette longueur d'onde par rapport au point isobestique du cyt b-559 (570nm) indique donc son degré de réduction. Lors des mesures de photoréduction, les thylacoïdes étaient illuminés par une lumière passée à travers un filtre d'eau puis un filtre rouge CS2-64. Un diaphragme mécanique contrôlait l'illumination de la cuvette contenant les thylacoïdes. Le tube photomultiplicateur était protégé par les filtres CS3-71 et CS4-96.

Les autres mesures spectrophotométriques effectuées concernaient le changement électrochromique mesuré entre 540 et 550 nm. Ce changement d'absorbance (C550) est interprété comme résultant de l'accumulation de charges au niveau de Q_A causant, par l'influence d'un champs électrique localisé dans le centre réactionnel après la séparation de charge, un changement électrochromique d'une molécule de Phéo-a intimement associée au centre réactionnel (van Gorkom, 1974; Melis et Schreiber, 1979; Jursinic et Dennenberg, 1988). La différence d'absorbance entre les faisceaux 540 moins 550 nm a été mesurée chez les thylacoïdes traités avec 0.5 mM FeCN, 0.5 μ M gramicidine et 10 μ M DCMU afin d'éliminer les contributions au changement d'absorbance causées par le cytochromes b/f, le P700 et un autre effet électrochromique associé au gradient de

protons dans les thylacoïdes (Melis et Schreiber, 1979; Jursinic et Dennenberg, 1988). Les conditions d'illuminations des thylacoïdes lors de ces mesures étaient identiques à celles utilisées pour la photoréduction du cyt b-559.

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Caractérisation de l'inhibition de l'activité du PSII par le mercure chez *Dunaliella tertiolecta*

Les premières études portant sur les effets inhibiteurs du mercure sur le transport d'électrons dans les chloroplastes ont indiqué que le ou les principaux sites d'inhibition du mercure se trouvent au niveau du PSI (Kimumura et Satoh, 1972; Honeycutt et Krogmann, 1972). Cependant, ces auteurs ont aussi identifié un autre site d'inhibition du mercure sur le coté oxydant du PSII. L'importance de ce site d'inhibition est demeurée sous-estimée malgré les résultats de de Filippis et al. (1981), démontrant chez *Euglena gracilis* que ce site d'inhibition était plus important que celui au niveau de la NADP-ferrodoxine oxido-réductase (PSI). Par ailleurs, d'autres auteurs ont suggéré un effet du mercure sur le coté réducteur du PSII (Radmer et Kok, 1975; Miles et al., 1973). Dans ce contexte, l'objectif de cette section est de caractériser le site ainsi que le mode d'action du mercure au niveau du PSII chez *Dunaliella tertiolecta*.

La Fig.13 montre l'activité en dégagement d'oxygène des cellules de *Dunaliella tertiolecta* en fonction du temps d'incubation, en présence de 50, 100 et 200 μM de HgCl_2 . Ces concentrations de mercure peuvent sembler élevées comparative-ment à celles retrouvées dans les milieux aquatiques contami-nées. Ceci s'explique par la grande concentration cellulaire

utilisée lors de ces essais comparativement à celle retrouvée en milieu naturel. En effet, Kimimura et Katoh (1972) ont démontré que l'effet inhibiteur du mercure sur le PSII était fonction du rapport Chl/mercure. Le pattern d'inhibition est différent selon la concentration utilisée. A 200 μM , le dégagement d'oxygène diminue de façon presque linéaire avec le temps d'incubation et l'inhibition est complète après 15 minutes. A 100 μM , l'inhibition est initialement retardée mais est totale après 60 minutes d'incubation. Cependant, chez les cellules traitées avec 50 μM HgCl_2 , il y a une stimulation évidente du dégagement d'oxygène qui est maximale à 20 minutes d'incubation. Cette stimulation du dégagement d'oxygène serait attribuée à l'effet du mercure sur le côté réducteur du PSII

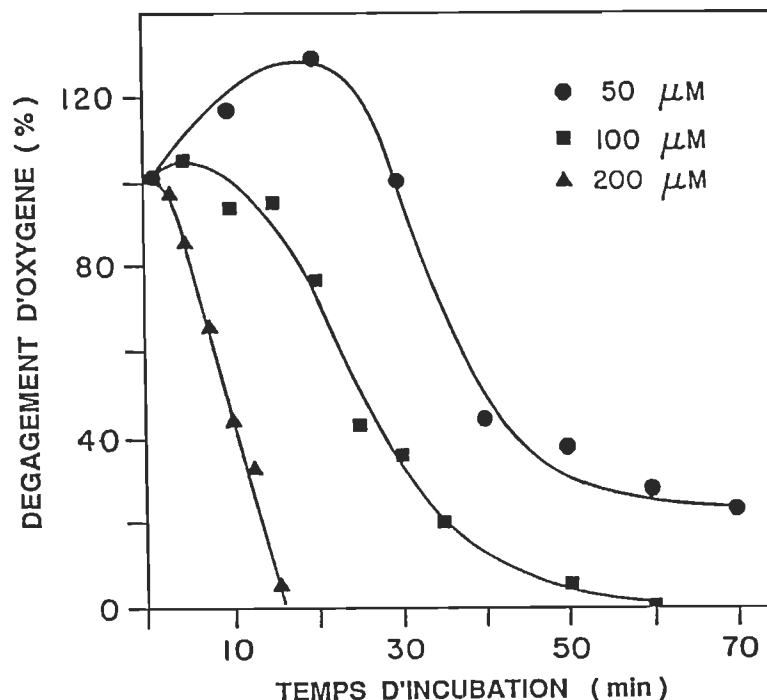


Fig.13 Dégagement d'oxygène par les cellules de *Dunaliella tertiolecta* en fonction du temps d'incubation en présence de 50 (●), 100 (■) et 200 (▲) μM HgCl_2 .

tel que suggéré par Miles et al. (1973). Dans ce cas, le mercure accepterait les électrons de Q_A . Par conséquent, le mercure pourrait temporairement prévenir l'effet limitant sur le dégagement d'oxygène causé par la saturation de la chaîne des transporteurs d'électrons au-delà du côté réducteur du PSII. Cette stimulation est annulée à des temps d'incubation supérieurs à 20 minutes, lorsque l'inhibition du complexe de dégagement d'oxygène devient dominante. Une telle interprétation du phénomène observé s'appuie sur le fait que le site Q_A se trouve en contact avec le stroma tandis que le complexe de dégagement d'oxygène est situé dans le lumen des thylacoïdes (Ort, 1986). Ainsi, lorsque le temps d'incubation est insuffisant pour obtenir un équilibre transmembranaire des concentrations de mercure dans les thylacoïdes, l'effet du mercure au niveau de Q_A serait prédominant. Puisque l'intérêt de ce travail portait principalement sur l'effet inhibiteur du mercure sur l'activité du PSII, un temps d'incubation suffisant a été utilisé par la suite afin d'obtenir l'effet inhibiteur maximal (75 min.), et ainsi éliminer cet effet artificiel et temporaire du mercure sur l'activité du PSII.

Les taux relatifs de dégagement d'oxygène des algues D.tertiolecta incubées pendant 75 minutes en présence de différentes concentrations de $HgCl_2$ sont présentés à la Fig.14. Une inhibition de 50% est observée à 40 μM tandis qu'à 80 μM $HgCl_2$, le dégagement d'oxygène était totalement inhibé. Ces concentrations sont inférieures à celles obtenues par

Overnell (1976), déterminées après seulement 15 minutes d'incubation des cellules de D.teriolecta en présence de HgCl_2 . Une telle différence met en évidence l'importance du temps d'incubation dans l'évaluation des effets inhibiteurs du mercure sur l'activité photosynthétique.

L'effet du mercure sur les courbes d'induction de fluorescence émises par les cellules de D.tertiolecta incubées en présence de différentes concentrations de HgCl_2 est présenté à la Fig.15. Lorsque la concentration de mercure est graduellement augmentée jusqu'à 80 μM , la fluorescence variable est

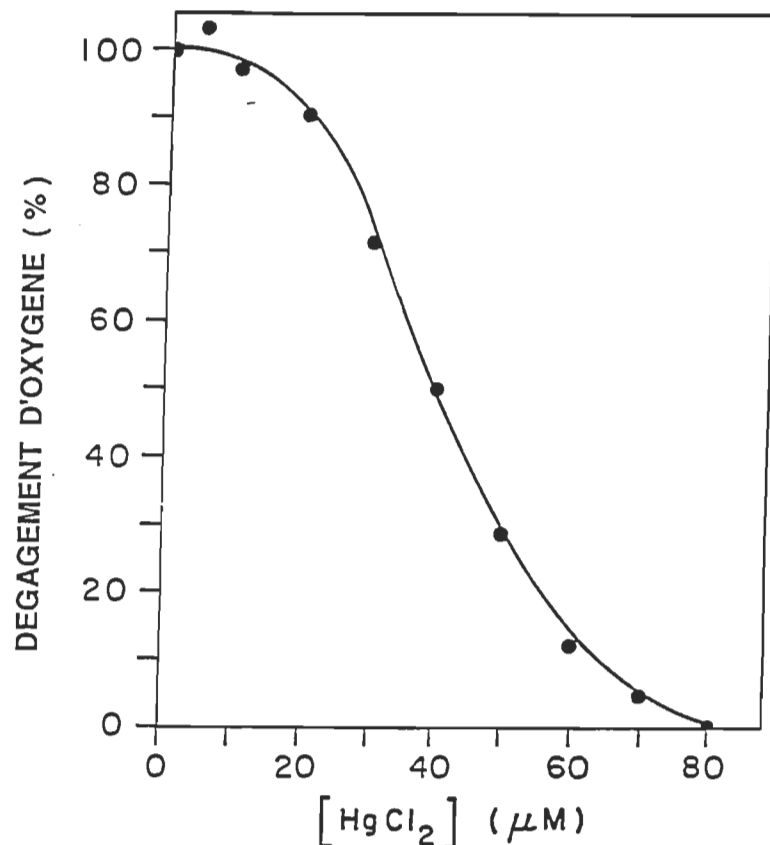


Fig. 14 Dégagement d'oxygène des cellules de Dunaliella tertiolecta incubées pendant 75 minutes en présence de différentes concentrations de HgCl_2 .

progressivement atténuée tandis que le niveau F_0 demeure inchangé. Ceci indique que les CCL ne sont pas altérés par les concentrations de mercure utilisées dans ce travail. Il est à remarquer que le degré d'atténuation de la fluorescence au niveau F_p est supérieur à celui observé au niveau F_r . Il est admis que la montée de fluorescence O-I reflète l'activité des PSII de type non- Q_B (Butko et Szalay, 1985; Chylla et

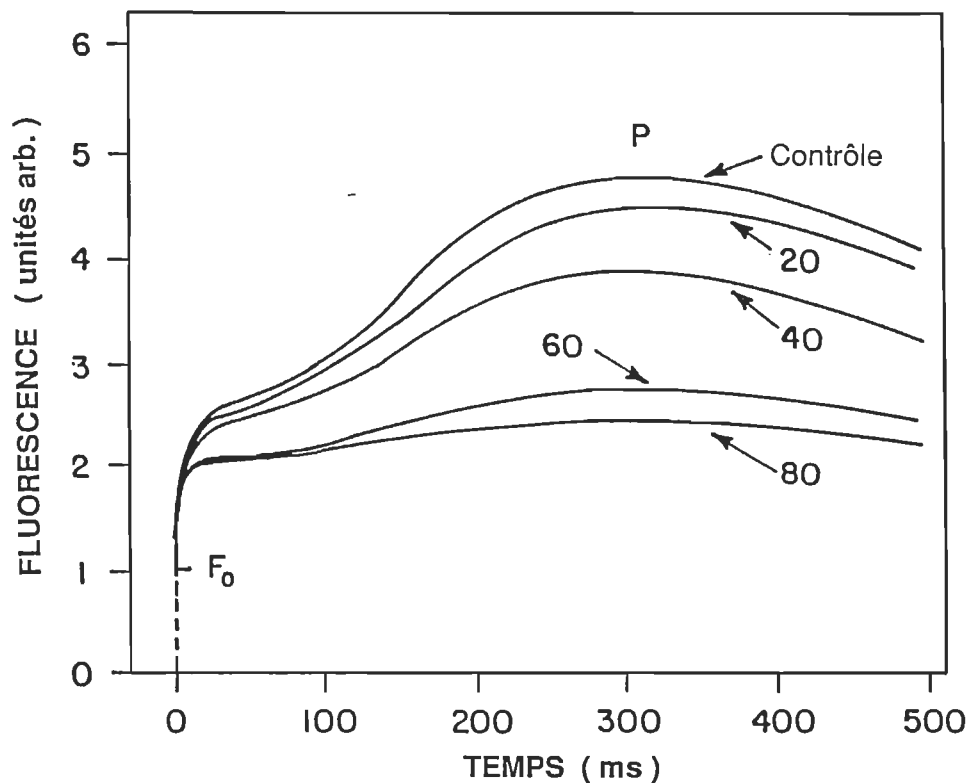


Fig.15 Courbes d'induction de fluorescence émise par les cellules de Dunaliella tertiolecta incubées en présence de différentes concentrations de $HgCl_2$. Les numéros indiquent la concentration de $HgCl_2$ en μM .

Whithmarsh, 1987; Guenther et al., 1988). La plus faible sensibilité de la montée de fluorescence O-I par rapport à la montée D-P suggère que la proportion des PSII reliés de la chaîne de transport d'électrons est plus sensible à l'effet inhibiteur du mercure que les PSII non-reliés. Ceci expliquerait la différence entre l'inhibition totale du dégagement d'oxygène à 80 μM (Fig.14) alors qu'une partie appréciable de la fluorescence est toujours présente à cette concentration. Cet aspect de l'hétérogénéité fonctionnelle des PSII vis-à-vis l'effet inhibiteur sera étudié en détail dans la partie 3.3.

La Fig.16 montre les pourcentages des intensités de fluorescence variable mesurée en présence et en absence de DCMU en fonction de la concentration de HgCl_2 . Dans les deux cas, une baisse importante de la fluorescence est observée entre 30 et 50 μM de HgCl_2 . La fluorescence tend vers un minimum à des concentrations de HgCl_2 supérieures à 50 μM . De plus, il est important de noter que la valeur $1-(F_0/F_p)$ est diminué par le mercure (de la même façon que F_v). Cette valeur représente le rendement photochimique de la fluorescence, et est donc une estimation valable du rendement quantique des réactions photochimiques du PSII (Malkin et al., 1981). La baisse de la fluorescence variable observée en présence de DCMU, isolant le PSII de la chaîne de transport d'électrons, peut être interprétée comme un effet inhibiteur du mercure soit sur le côté oxydant du PSII ou soit au niveau du centre réactionnel du PSII (Butler 1972; Popovic et al., 1988). De plus, la grande

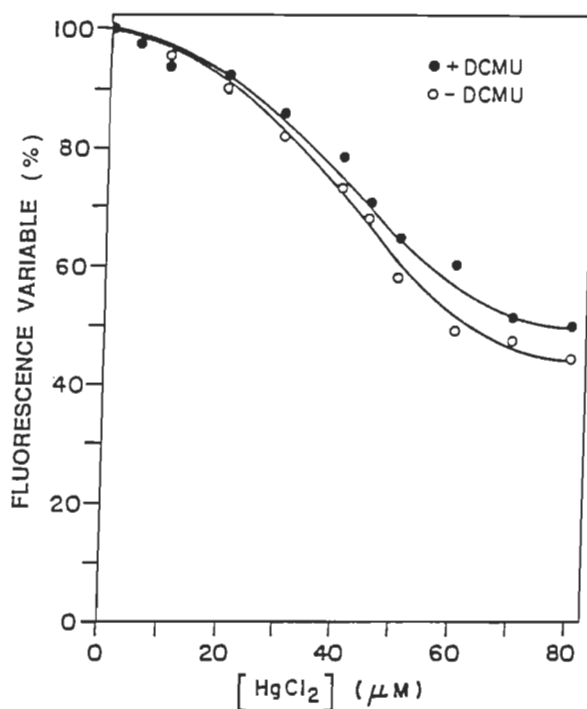


Fig.16 Pourcentages des intensités de la fluorescence variable mesurée en présence et en absence de DCMU en fonction de la concentration de HgCl_2 chez D.tertiolecta.

similitude entre la baisse de fluorescence avec et sans DCMU montre que l'inhibition du PSII mesurée par la fluorescence est principalement liée à l'inhibition de la photochimie du PSII, et non pas à la formation du gradient transmembranaire de protons causant une baisse de fluorescence ("energy-quenching") (Krause et Weis, 1984).

Dans le but d'identifier le site d'inhibition du mercure au niveau du PSII, les courbes de fluorescence ont été mesurées en présence de DCMU lorsque le donneur d'électrons au centre réactionnel du PSII était l'eau ou l'hydroxylamine (Fig.17). L'hydroxylamine à une concentration de 10 mM inhibe complètement le dégagement d'oxygène chez les cellules de D.tertiolecta (résultats non présentés). A cette concentra-

tion, l'hydroxylamine agit comme donneur d'électrons en réduisant le donneur primaire Z du PSII (Cheniae et Martin, 1971). Une intensité équivalente de fluorescence était mesurée lorsque l'eau et l'hydroxylamine servaient comme donneur d'électrons. Le plus long temps requis pour atteindre le niveau maximal de fluorescence en présence de l'hydroxylamine est attribué à sa plus faible efficacité à fournir les électrons au centre réactionnel (Deehan et al., 1976). Les courbes de fluorescence de la Fig.17 montrent que le mercure abaisse l'intensité de la fluorescence lorsque l'eau est le donneur d'électrons, mais l'intensité de la fluorescence est restaurée presque complètement chez les algues en présence de hydroxyl-

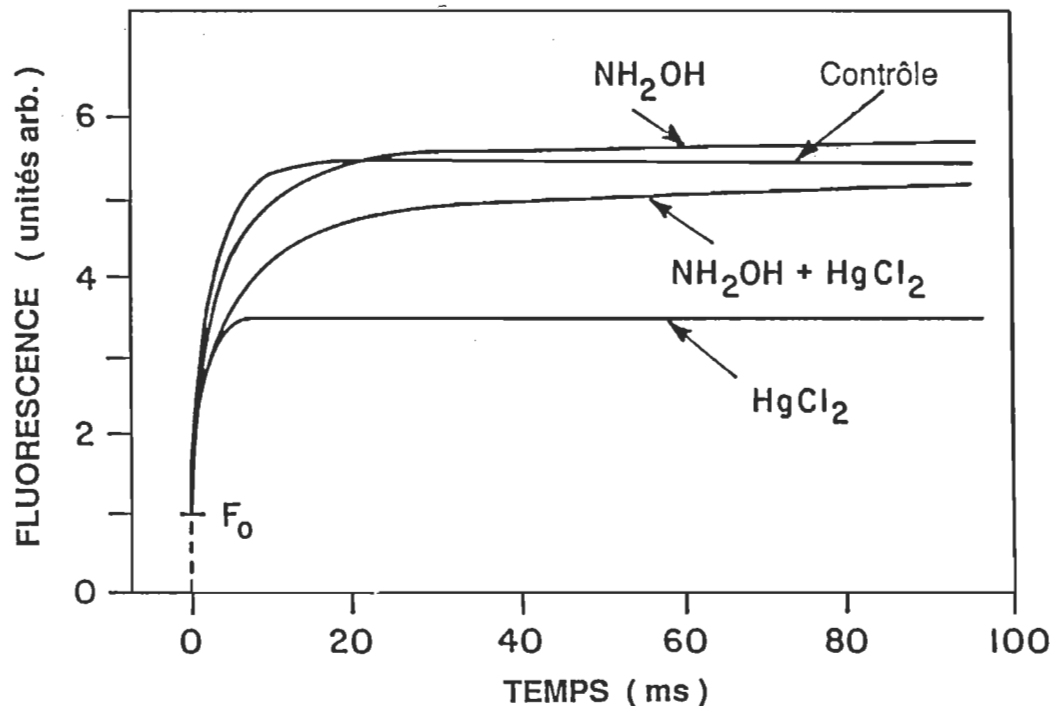


Fig.17 Courbes d'induction de fluorescence mesurée en présence de DCMU chez des algues traitées ou non avec différents additifs: A) contrôle, B) NH_2OH 10 mM, C) $HgCl_2$ 50uM et D) NH_2OH 10 mM + $HgCl_2$ 50 uM.

amine. Ces résultats indiquent que le site d'inhibition du mercure sur le coté oxydant du PSII chez D.tertiolecta se trouve au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Cette conclusion confirme les résultats obtenus par de Filippis et al. (1981), qui observaient une restauration d'activité spécifique au PSII par l'addition du donneur d'électrons diphénylcarbazine (DPC) chez Euglena gracilis.

Les résultats présentés à la Fig.18 nous permettent de déterminer si l'inhibition du PSII par le mercure est de type tout ou rien, c'est-à-dire si le mercure inhibe complètement une fraction des PSII ou si tous les PSII sont graduellement inhibés par le mercure. Une telle déduction est possible par une combinaison originale des mesures du taux de photoréduction de l'accepteur primaire du PSII Q_A d'une part, et d'autre part, de l'aire complémentaire. Le taux de photoréduction des Q_A (voir section 2.2.2) a été estimé par la pente K des droites semilogarithmiques $\ln [F_{max}-F(t)]$ en fonction du temps (Manodori et Melis, 1986). Il est évident que le mercure n'affecte pas le taux de photoréduction des Q_A associés aux centres réactionnels photochimiquement actifs. Cependant, l'activité photochimique des PSII chez les cellules de D.tertiolecta, estimée par l'aire complémentaire en présence et en absence de DCMU, est diminuée suite à l'incubation en présence de mercure (Fig.18). L'aire complémentaire est proportionnelle à la quantité d'accepteurs d'électrons photochimiquement réduits (Lavorel et al., 1986). En présence de DCMU, cette quantité d'accepteurs d'électrons est limitée à

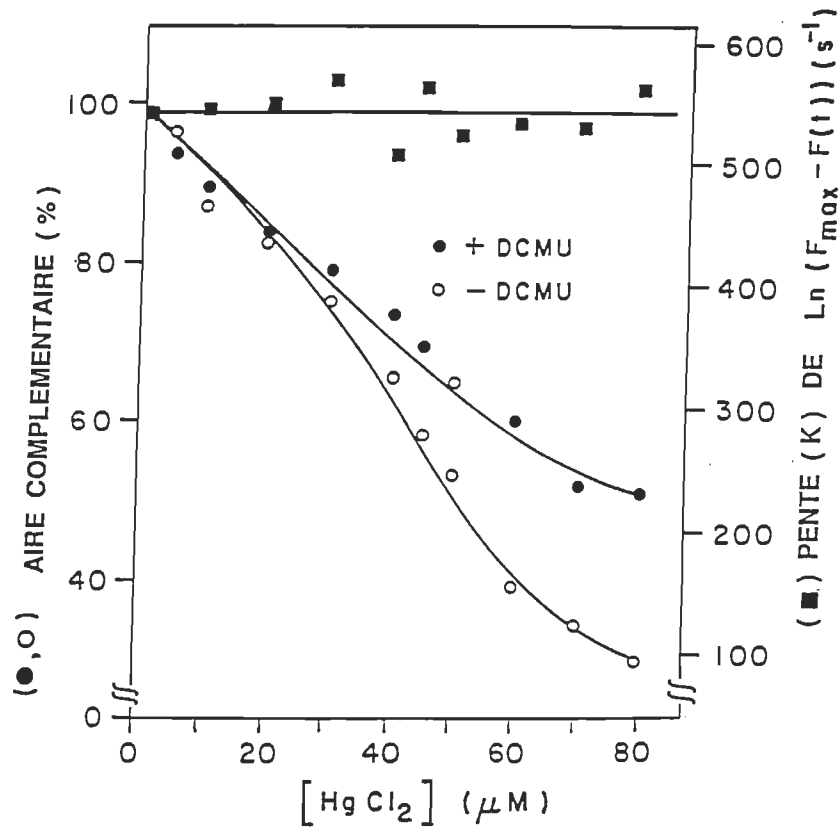


Fig.18 Taux de photoréduction de Q_A évalué en présence de DCMU par la pente de $\ln [F_{\max} - F(t)]$ en fonction du temps et aire complémentaire mesurée en présence et en absence de DCMU chez des cellules d'algues incubées avec différentes concentrations de $HgCl_2$.

l'accepteurs primaire Q_A . Puisqu'il n'existe qu'un seul Q_A par centre réactionnel, l'aire complémentaire mesurée en présence de DCMU est donc proportionnelle à la quantité de centres réactionnels photochimiquement actifs. Cette relation est valide si et seulement si le taux de photochimie n'est pas affecté (Malkin et al., 1981; Lavorel et al., 1986). Considérant 1) que le taux de photochimie du PSII n'est pas affecté, 2) que le rendement photochimique du PSII est diminué par le mercure (voir discussion des résultats de la Fig.16) et 3) la

quantité d'accepteurs d'électrons photoréduits (telle qu'estimée par l'aire complémentaire) est diminuée par le mercure, nous pouvons donc conclure de façon claire qu'une partie seulement des centres réactionnels du PSII est totalement inactivée par le mercure alors que l'autre partie semble intacte. Ces résultats supportent le modèle actuel de l'organisation fonctionnelle entre le complexe de dégagement d'oxygène et le centre réactionnel du PSII (Martin et Ort, 1982).

Les résultats de la Fig.18 montrant l'inhibition par le mercure de l'aire complémentaire mesurée en présence et en absence de DCMU fournissent deux informations additionnelles. Tout d'abord, la baisse de l'aire complémentaire observée en présence de DCMU exclue la possibilité que dans nos conditions, le mercure accepte de façon significative les électrons de Q_A , tel que proposé par Miles et al. (1973) chez des chloroplastes d'épinards. Deuxièmement, l'aire complémentaire mesurée en absence de DCMU est inhibée dans une plus grande proportion que celle mesurée en présence de DCMU. Ceci suggère donc la présence d'autre(s) site(s) d'inhibition de faible importance du mercure au-delà de Q_A . De plus, cette observation confirme que le PSII est le site le plus sensible au mercure dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques chez D.tertiolecta.

3.2 Analyse de la baisse de la fluorescence variable causée par le mercure selon la méthode Stern-Volmer modifiée

L'ensemble des résultats précédents décrivent les caractéristiques de l'effet inhibiteur du mercure sur l'activité des PSII chez D.tertiolecta. Dans nos conditions, le mercure a un effet inhibiteur au niveau du complexe de dégagement d'oxygène, ce qui induit une inactivation du centre réactionnel associé, et conséquemment, la baisse de la fluorescence émise par les PSII.

Une caractérisation plus précise de l'atténuation de la fluorescence causée par le mercure chez D.tertiolecta demande de nouveaux paramètres nécessaires à une meilleure compréhension de l'inhibition du PSII par le mercure. Récemment, il fût démontré que la méthode d'analyse Stern-Volmer peut adéquatement fournir des paramètres utiles à la compréhension des mécanismes responsables de l'atténuation de la fluorescence dans les chloroplastes (Karuktis et al. 1987, 1988). Les résultats qui suivent découlent d'une application nouvelle et originale de l'analyse Stern-Volmer permettant de mieux comprendre l'effet inhibiteur du mercure sur le PSII.

Tout d'abord, la Fig.19 présente d'une façon détaillée les pourcentages de fluorescence variable en fonction de la concentration de mercure chez les cellules d'algues traitées avec le DCMU. Les cellules ont été incubées à l'obscurité pendant 30 minutes et ensuite incubées pendant 15, 30, 45, 60 ou 75 minutes toujours à l'obscurité en présence de différentes con-

centrations de HgCl_2 . La baisse de fluorescence est dépendante du temps d'incubation et de la concentration de mercure. La forme des courbes des pourcentages de F_{vmax} en fonction de la concentration de mercure pour les différents temps d'incubation est similaire, indiquant que le temps d'incubation n'influence pas le pattern d'inhibition du PSII par le mercure. De plus, il est important de noter que peu importe la concentration de mercure ou le temps d'incubation utilisés, 50% de la fluorescence variable ne peut être atténuée. A la Fig.20, nous constatons que la concentration de HgCl_2 requise pour abaisser de 50% la fluorescence variable diminue lorsque le temps d'incubation augmente. Il semble qu'un temps d'incuba-

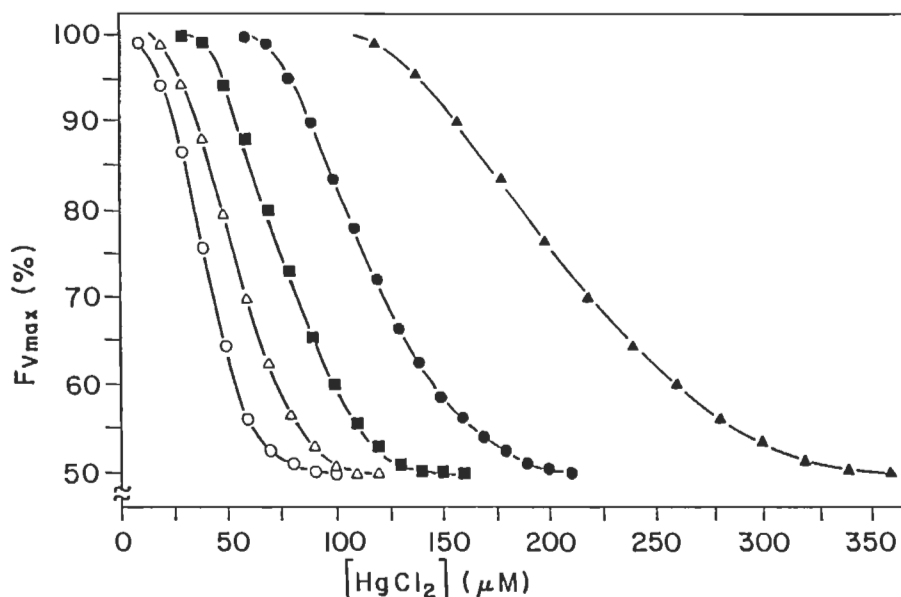


Fig.19 Pourcentages de la fluorescence variable mesurée en présence de DCMU émise par des cellules de D.tertiolecta incubées en présence de différentes concentrations de HgCl_2 pendant 15 (▲), 30 (●), 45 (■), 60 (△) et 75 (○) min.

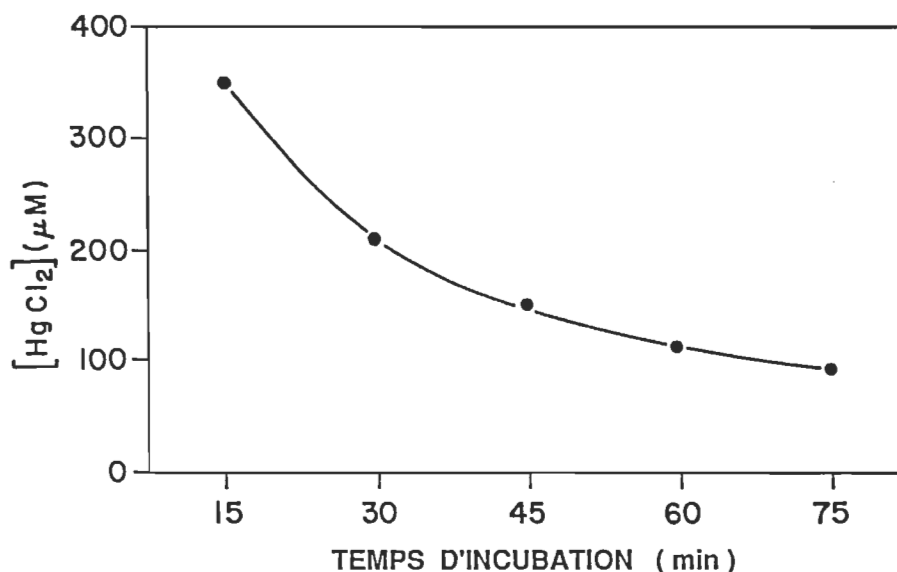


Fig.20 Concentration de HgCl_2 requise pour atténuer 50% de la fluorescence variable en fonction du temps d'incubation

tion supérieur à 75 minutes ne change pas de façon appréciable la concentration de HgCl_2 requise pour abaisser 50% de $F_{v\max}$, indiquant qu'un équilibre entre les concentrations interne et externe de mercure est atteint. La forme exponentielle de la relation entre le temps d'incubation et la concentration de HgCl_2 requise pour abaisser 50% de $F_{v\max}$ est similaire à la cinétique typique de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'un soluté diffusant dans une cellule (Walker et Pitman, 1976). Par conséquent, il est évident que la concentration intracellulaire de Hg^{2+} (responsable de la baisse de la fluorescence) atteint un équilibre peu après 75 minutes d'incubation.

Pour analyser la baisse de fluorescence induite par le mercure, l'équation classique de Stern-Volmer fut utilisée:

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

où I_0 et I représentent respectivement l'intensité de fluorescence variable en absence et en présence de mercure (le "Quencher"), K_{sv} est la constante de Stern-Volmer et $[Q]$ est la concentration de $HgCl_2$ (Lakowicz, 1984; Karuktis et al., 1987, 1988). Les courbes résultantes pour les différents temps d'incubation ont une forme sigmoïdale et montrent un plateau à $I_0/I = 2.0$ (Fig.21). La présence d'un tel plateau démontre la limitation de l'équation Stern-Volmer classique dans l'analyse de la baisse de la partie sensible de la fluorescence par le mercure. Dans ce cas, l'équation Stern-Volmer modifiée est utilisée sous cette forme:

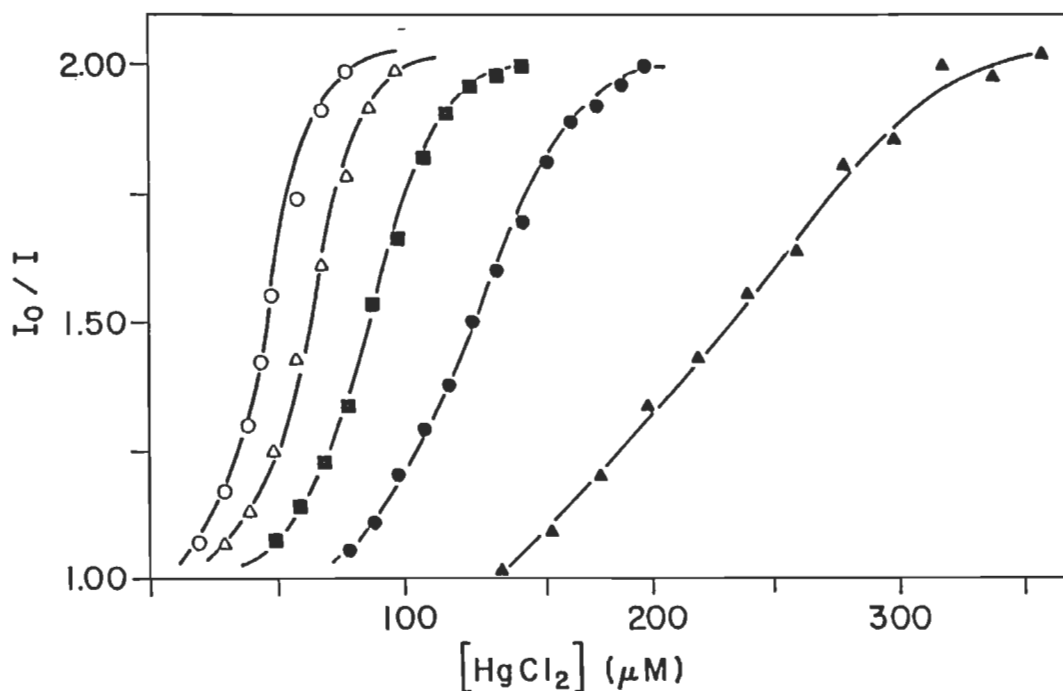


Fig.21 Représentation de la baisse de la fluorescence variable causée par le mercure après 15 (▲), 30 (●), 45 (■), 60 (Δ) et 75 (○) min d'incubation selon l'équation classique de Stern-Volmer.

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{F_s K_{sv} [Q]} + \frac{1}{F_s} \quad (2)$$

où ΔI représente la différence entre les intensités de fluorescence variable maximale (F_{vmax}) en présence et en absence de mercure, et F_s représente la fraction sensible de la fluorescence vis-à-vis l'inhibiteur (Lakowicz 1984; Karuktis et al. 1987, 1988). Par cette équation, les courbes résultantes sont courbées et tendent à une valeur de 2.0 sur l'axe $I_0/\Delta I$ (Fig.22). Il est évident que la baisse de la fluorescence par le mercure ne peut être décrite par la relation linéaire définie selon l'équation Stern-Volmer modifiée

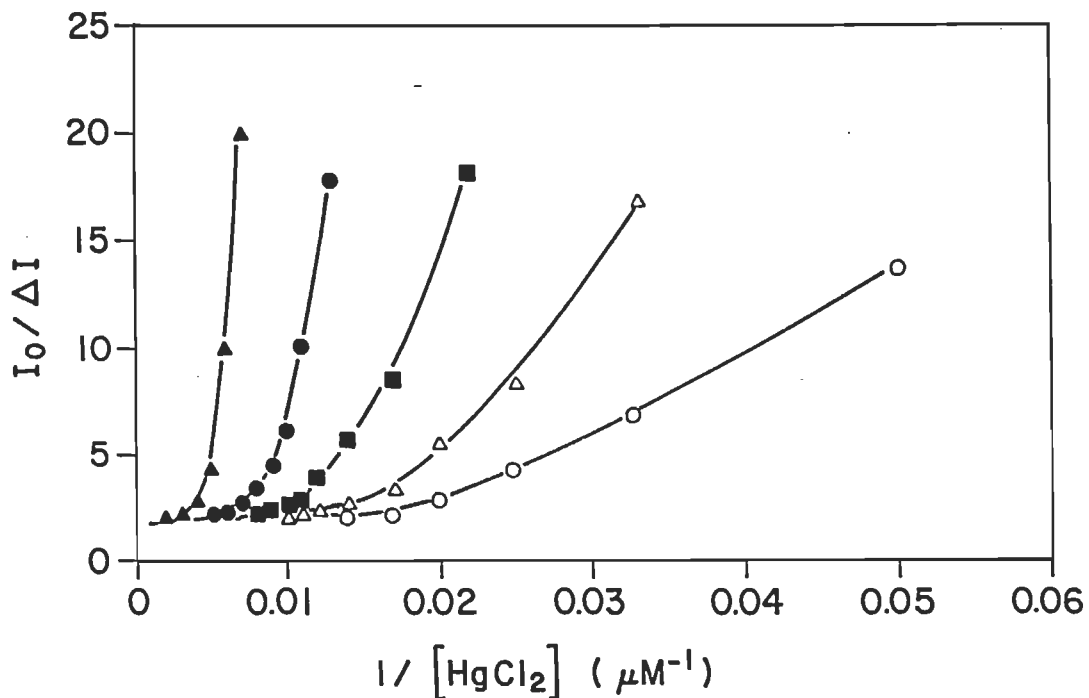


Fig.22 Diminution de la fluorescence variable chez D.tertiolecta causée par le mercure après 15 (▲), 30 (●), 45 (■), 60 (△) et 75 (○) min d'incubation selon l'équation modifiée de Stern-Volmer.

(eq.2). Cependant, il est important de remarquer la similarité existant entre les courbes obtenues par l'utilisation de l'équation 2 et les courbes de l'activité enzymatique spécifiques aux enzymes allostériques provenant de l'équation Lineweaver-Burk (Segel, 1975). De plus, cette dernière équation est très similaire à l'équation Stern-Volmer modifiée. Ces analogies sont d'autant plus frappantes que les deux types d'équations expriment quantitativement la variation de paramètres en fonction de la quantité de substrat fixés sur l'enzyme ou le fluorophore (Segel, 1975; Lakowich, 1984). Pour tenir compte de la coopérativité entre les multiples sites de fixation du substrat sur l'enzyme allostérique, l'équation Lineweaver-Burk est utilisée dans ce cas telle que:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}[S]^{N_{\text{app}}}} \quad (3)$$

où V_i et V_{\max} sont respectivement les vitesses initiale et maximale de la réaction enzymatique, $[S]$ est la concentration du substrat, K_m est la constante de Michaelis-Menten qui correspond à la concentration du substrat requise pour obtenir 50% de V_{\max} , et N_{app} représente le nombre apparent de site de fixation du substrat sur l'enzyme (Segel, 1975). Par l'analogie entre les courbes obtenues et les équations Stern-Volmer modifiée (eq.2) et Lineweaver-Burk (eq.3), une modification additionnelle de l'équation Stern-Volmer est proposée:

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{F_s} + \frac{1}{F_s K_{sv} [Q]^{N_{app}}} \quad (4)$$

où la valeur de Napp est obtenue par la puissance qui linéarise les courbes tracées selon cette équation. A la Fig.23, une relation linéaire est observée lorsque Napp = 3.72 (valeur obtenue par itérations successives) pour les résultats correspondant à 75 minutes d'incubation, lorsque la baisse de la fluorescence par le mercure a atteint l'équilibre (voir Fig.20). En utilisant cette méthode, le nombre apparent de site de "fixation" du mercure au niveau du PSII affectant la fluorescence peut être déterminé. Puisque la valeur de Napp est 3.72, le nombre minimal de site de "fixation" du mercure au niveau du PSII est 4. De plus, puisque la valeur de la droite à l'ordonnée est 2.0 (et que la valeur à l'ordonnée est égale à 1/Fs), la fraction calculée de la fluorescence variable sensible à l'effet du mercure est 0.5. Enfin, la valeur de la constante Ksv calculée à partir de la pente de la droite est $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Cette valeur représente la réciproque de la concentration de HgCl_2 nécessaire pour induire la moitié de la baisse maximale de la fluorescence variable causée par le mercure (75% de Fvmax à 40 μM HgCl_2).

Il a été démontré à la section 3.1 que le mercure inhibe le complexe de dégagement d'oxygène, induisant ainsi une inactivation complète de certains PSII. Plus tôt, il a été démontré que la baisse de l'intensité de la fluorescence de certaines protéines par le mercure est due à un changement conforma-

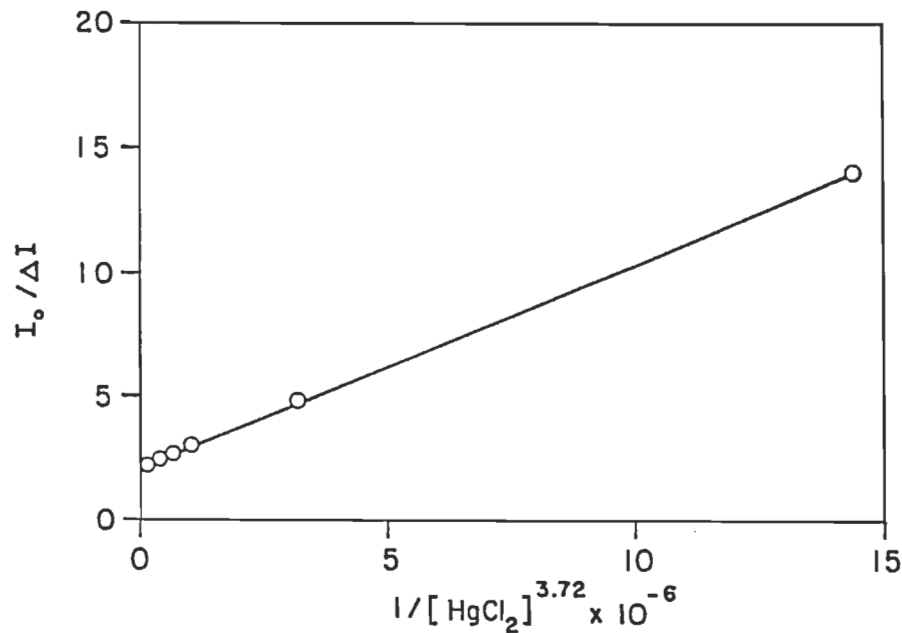


Fig.23 Forme linéarisée de la relation décrivant l'atténuation de la fluorescence chez D.tertiolecta et la concentration de mercure après 75 minutes d'incubation selon l'équation Stern-Volmer remodifiée.

tionnel de la protéine suite à la formation d'un complexe entre le mercure et les groupes sulphydryles (Chen, 1976). De plus, il a été démontré que l'effet du cuivre sur la fluorescence dans les chloroplastes résulte de la fixation du cuivre sur une protéine du PSII (Vierke et Struckmeier, 1977, 1978). Considérant ces interactions métal-protéine dans le sens de mes résultats, il m'est permis d'assumer que l'effet du mercure sur la fluorescence variable est la conséquence de la fixation du mercure avec les protéines associées avec le complexe de dégagement d'oxygène. Dans ce sens, la diminution de la fluorescence observée suite à l'effet du mercure est analogue à une atténuation de la fluorescence par un effet

statique ("static quenching"), c'est-à-dire une baisse de la fluorescence résultant de la formation d'un complexe non-fluorescent entre le fluorophore et l'inhibiteur (Lakowicz, 1984). De plus, le nombre de quatre sites apparents de fixation suggère que le mercure pourrait interagir avec les quatre atomes de manganèse du complexe de dégagement d'oxygène impliqués directement dans la photolyse de l'eau (Govindjee et al, 1985). De façon générale, la présente analyse de la baisse de la fluorescence variable par la mercure pourra contribuer à la compréhension de l'action d'autres agents atténuant la fluorescence de divers fluorophores par de multiples sites de liaison.

3.3 Etude de l'hétérogénéité fonctionnelle des PSII par l'effet inhibiteur du mercure

L'analyse de la fluorescence émise par les algues et les chloroplastes a permis de découvrir deux aspects de l'hétérogénéité des PSII. Ces deux formes d'hétérogénéité sont définies par les propriétés du système collecteur de lumière (PSIIa et PSIIb) et les propriétés de transport d'électrons au niveau du côté réducteur du PSII (PSII de type Q_A et non- Q_A). Cependant, la relation entre ces formes d'hétérogénéités est toujours inconnue (Black et al., 1986; voir aussi section 1.2.3). Considérant la caractérisation de l'effet inhibiteur du mercure sur le PSII chez D.tertiolecta (sections 3.1 et 3.2), il semble que l'évaluation des susceptibilités

spécifiques aux PSIIa et PSIIb et aux PSII de type Q_A et non- Q_A vis-à-vis l'effet inhibiteur du mercure permettrait d'estimer le degré de relation existant entre ces deux types d'hétérogénéités.

A cette fin, les cellules de D.tertiolecta (7 μ g Chl tot/ml), pré-adaptées à l'obscurité, ont été incubées en présence de diverses concentrations de $HgCl_2$ pendant 75 minutes. La proportion des PSIIa et PSIIb a été évaluée à partir des courbes de fluorescence mesurées en présence de DCMU sur 200 ms, selon l'analyse semilogarithmique de l'accroissement de l'aire complémentaire (Melis et Homann, 1975; voir section 2.2.2, Fig.11). La proportion entre les PSII de type Q_A et non- Q_A fût estimée à partir des courbes de fluorescence mesurées en absence de DCMU sur 500 ms. Puisque la fluorescence rapide $F_v^{O_2}$ est associée aux PSII de type non- Q_A , le rapport entre $F_v^{O_2}$ et la fluorescence variable totale indique la proportion des PSII de type non- Q_A (Cahen et al., 1976; Butko et Szalay, 1985; Guenther et al., 1988).

La Fig.24 montre les pourcentages des fluorescences variables rapide ($F_v^{O_2}$) et lente (F_v^{DP}) en fonction de la concentration de mercure. L'intensité de F_v^{DP} diminue linéairement lorsque la concentration de mercure augmente et est pratiquement éliminée à 80 μ M $HgCl_2$. Cependant, l'intensité de $F_v^{O_2}$ n'est que partiellement affectée par le mercure, parce que 55% de $F_v^{O_2}$ est non-sensible à 80 μ M $HgCl_2$.

La phase lente de la fluorescence entre les niveaux D et P

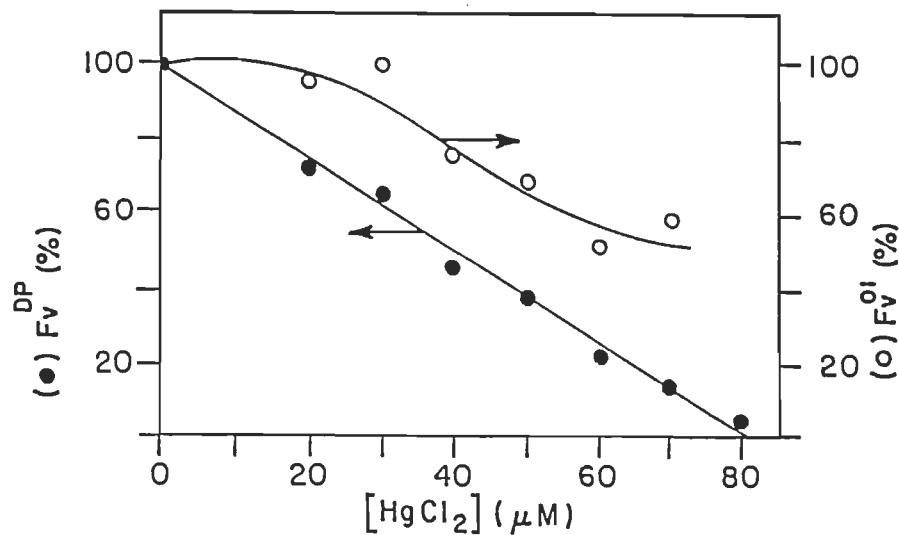


Fig.24 Pourcentages des fluorescences variables lente (F_v^{DP}) et rapide (F_v^{OI}) mesurées chez D.tertiolecta après 75 min d'incubation en fonction de la concentration de HgCl_2

est reconnue comme résultant de l'activité photochimique des PSII de type Q_B et de la réduction de la chaîne des transporteurs d'électrons allant de Q_B jusqu'au PSI (Govindjee et Satoh, 1986). Pour vérifier la validité de cette relation chez les cellules de D.tertiolecta incubées en présence de différentes concentrations de HgCl_2 , j'ai examiné la dépendance entre l'intensité de F_v^{DP} et les taux de dégagement d'oxygène correspondants, mesurés à une concentration donnée de HgCl_2 (Fig.25). Une bonne corrélation (coefficient de corrélation = 0.98) existe entre ces deux paramètres, démontrant que l'intensité de F_v^{DP} peut être un bon indicateur des PSII de type Q_B , soit des PSII connectés à la chaîne des transporteurs d'électrons.

Ensuite, les proportions des PSII de type non- Q_B ont été évaluées à partir des ratios F_v^{OI}/F_v (Cahen et al, 1976;

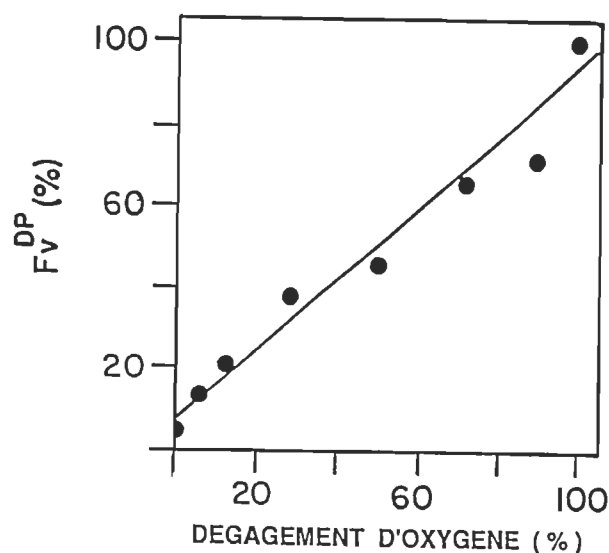


Fig.25 Corrélation entre l'intensité de Fv^{DP} et le taux de dégagement d'oxygène mesurés à une concentration donnée de $HgCl_2$.

Butko et Szalay, 1985; Guenther et al., 1988). La proportion des PSII de type non- Q_B augmente de 0.44 à 0.83 lorsque la concentration de $HgCl_2$ augmente de 0 à 80 μM (Fig.26). Nécessairement, la proportion des PSII de type Q_B passe de 0.56 à 0.17. Ces modifications des proportions entre les deux types de PSII indiquent clairement qu'il existe parmi les PSII des susceptibilités différentes vis-à-vis l'effet du mercure. En effet, les PSII de type Q_B sont beaucoup plus sensibles à la présence de cet inhibiteur que les PSII de type non- Q_B .

Dans le but d'établir le degré de relation entre les populations de PSIIa et PSIIb et les populations des PSII de types Q_B et non- Q_B , les proportions de PSIIa et PSIIb ont été évaluées à partir des courbes d'induction de fluorescence mesurées en présence de DCMU (Fig.27A). Malgré la baisse de l'intensité de la fluorescence causée par la présence de mer-

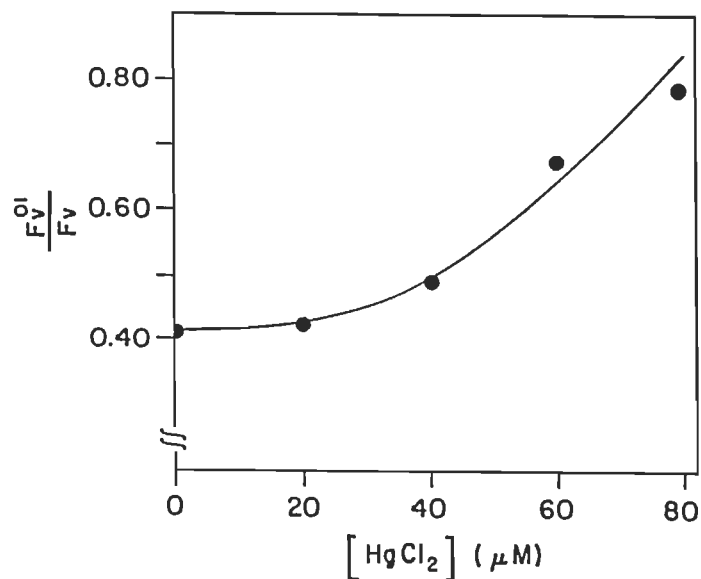


Fig.26 Proportions des PSII de type non-Q_A évaluées par le rapport Fv^{O_2}/Fv en fonction de concentration de $HgCl_2$ chez D.tertiolecta.

cure, la forme des courbes n'était pas altérée. Par conséquent, l'analyse semilogarithmique du taux de l'accroissement de l'aire complémentaire normalisée (Fig.27B) indique aucune différence pour les différentes concentrations de mercure utilisées. Les proportions de PSIIb (Bmax%) obtenues par l'extrapolation de la phase lente jusqu'à l'ordonnée donne une proportion de PSIIb de $24 \pm 3\%$, et par conséquent, 76% pour PSIIa. Ces valeurs se comparent bien à celles obtenues par d'autres auteurs avec des chloroplastes d'épinards intacts (Horton, 1981; Melis, 1985).

Il a été démontré plus tôt que la baisse de fluorescence causée par le mercure est similaire en présence et en absence de DCMU (voir Fig.16). De plus, il est important de mentionner que pour nos conditions expérimentales, l'intensité de fluo-

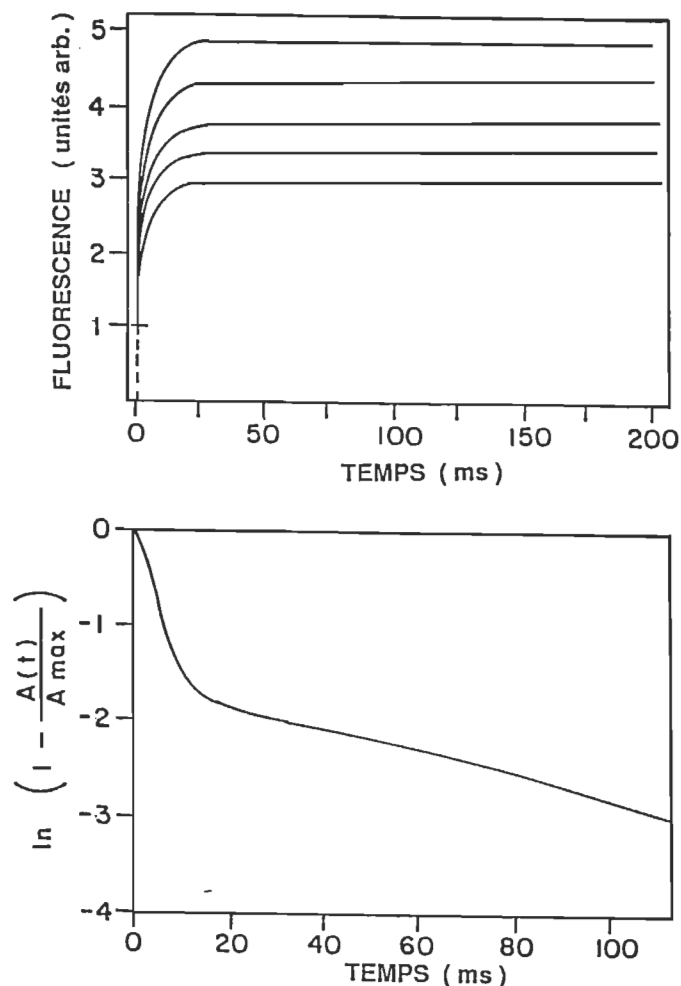


Fig.27 A) Courbes d'induction de fluorescence mesurée en présence de DCMU à partir de cellules de D.tertiolecta incubées en présence de différentes concentrations de HgCl_2 . B) Analyse semilogarithmique de l'accroissement de l'aire complémentaire correspondante aux courbes de fluorescence de la Fig.27A.

rescence au niveau F_p obtenu en absence de DCMU est égale au niveau de fluorescence maximale F_{\max} mesuré en présence de DCMU. Ceci nous permet donc de comparer l'effet du mercure sur les proportions de PSII de type non-Qb et de PSIIb. Tout d'abord, l'analyse des courbes de fluorescence mesurées en absence de DCMU a montré une augmentation de la proportion

des PSII de type non- Q_B (estimée par le ratio Fv^{O_2}/Fv) suite à l'effet inhibiteur du mercure. Ceci indique donc une forte différence de sensibilité des PSII vis-à-vis le mercure selon leur habileté à transporter les électrons de Q_A^- jusqu'aux PQ. La fiabilité de cette conclusion est supportée par la forte corrélation entre les taux de dégagement d'oxygène et les intensités de la fluorescence Fv^{O_2} chez les algues inhibées par le mercure (voir Fig.25). Par ailleurs, il est clair que la proportion entre les PSIIa et b n'est pas affectée par le mercure. Suite à ces observations, la conclusion qui s'impose est l'absence de relation chez les cellules de *D.tertiolecta* inhibées par le mercure entre les populations de PSIIb et de PSII de type non- Q_B .

3.4 Evidence d'un transport cyclique d'électrons autour du PSII induit par le mercure chez les thylacoïdes d'orge.

Les effets inhibiteurs du mercure sur l'activité photochimique des PSII dans les thylacoïdes d'orge ont été étudiés dans le but de mieux comprendre les modifications causées par le mercure sur le transport d'électrons dans le PSII. Tout d'abord, l'effet du mercure sur la fluorescence variable a été mesuré en fonction du temps d'incubation (Fig.28). L'effet maximal pour une concentration de 25 μM $HgCl_2$ est observé après 15 min d'incubation, et reste constant jusqu'à 60 min environ. Dans ces conditions d'incubation, une atténuation maximale de près de 85% de la fluorescence variable a été

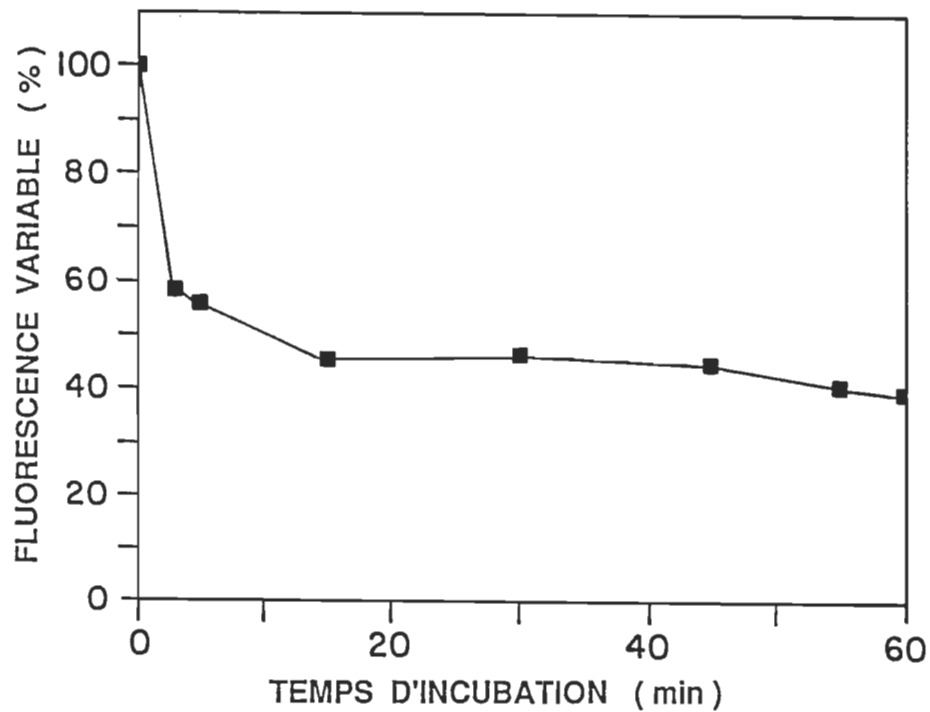


Fig.28 Intensités de la fluorescence variable chez des thylacoïdes d'orge incubés en présence de 25 μM HgCl_2 en fonction du temps d'incubation.

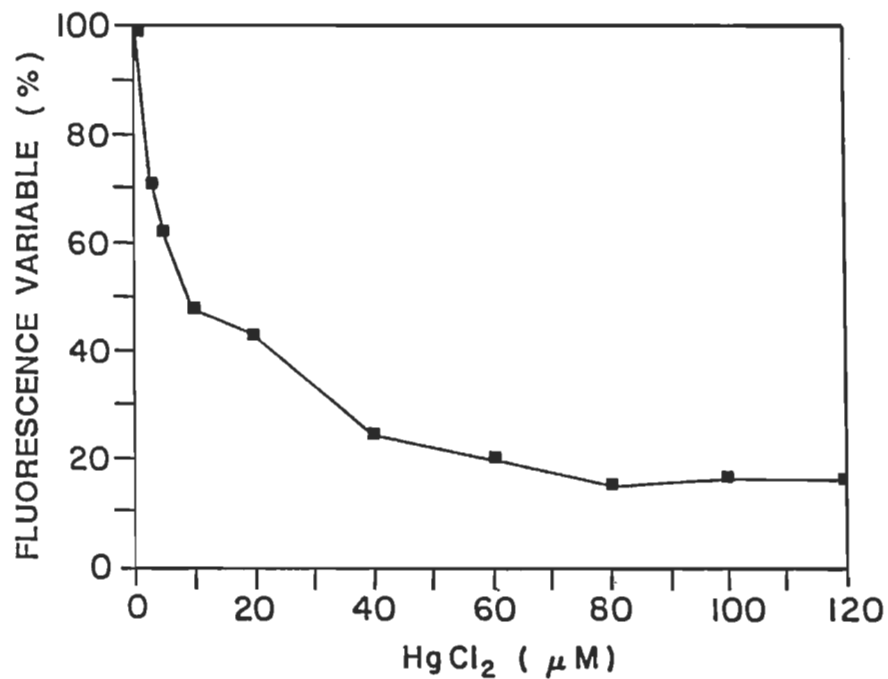


Fig.29 Relation entre la concentration de HgCl_2 et l'intensité de la fluorescence variable chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 minutes en présence de mercure.

observée suite à l'incubation des thylacoïdes en présence de 80 μM de HgCl_2 (Fig.29). Une atténuation équivalente de la fluorescence variable causée par le mercure était mesurée en présence et en absence de DCMU (résultats non-présentés).

L'effet du mercure a aussi été mesuré sur le dégagement d'oxygène (Fig.30). Une inhibition totale est observée à 60 μM HgCl_2 . Ces résultats confirment une inhibition du transport d'électrons sur le côté oxydant du PSII causée par le mercure. Cependant, ces résultats ne peuvent être comparés avec ceux obtenus chez D.tertiolecta, considérant la différence d'espèce et les conditions expérimentales (in vivo versus in vitro). Par exemple, la fluorescence atténuée par l'effet

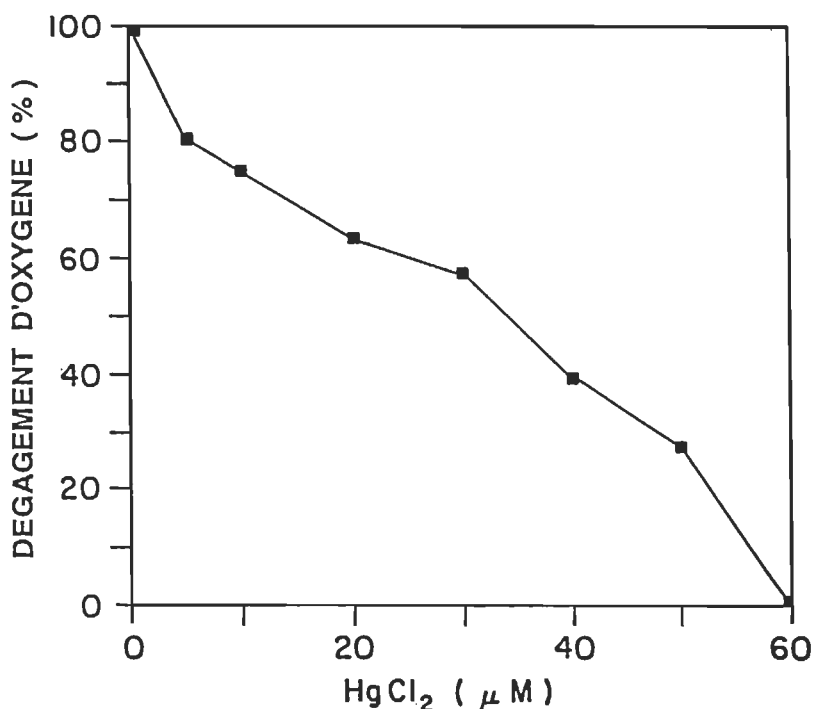


Fig.30 Diminution des taux de dégagement d'oxygène chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 minutes en présence de différentes concentrations de HgCl_2 .

du mercure chez les thylacoïdes d'orge ne peut être restaurée que très partiellement lorsque l'hydroxylamine remplaçait l'eau comme donneur d'électrons au PSII (Fig.31), Ceci est contraire à l'effet observé chez D.tertiolecta (Fig.17). Il est important de noter que Honeycutt et Krogmann (1972) ont déjà démontré que chez des thylacoïdes d'épinard inhibés par l'acétate phényl mercurique, l'habileté de l'hydroxylamine à restaurer l'activité des PSII était perdue après le lavage des chloroplastes par une solution de sucrose et de NaCl. Ceci démontre donc l'importance des conditions expérimentales et de l'intégrité des thylacoïdes dans l'habileté de l'hydroxylamine à renverser l'effet du mercure et suggère une complexité quant au site d'inhibition du mercure sur le côté oxydant du PSII.

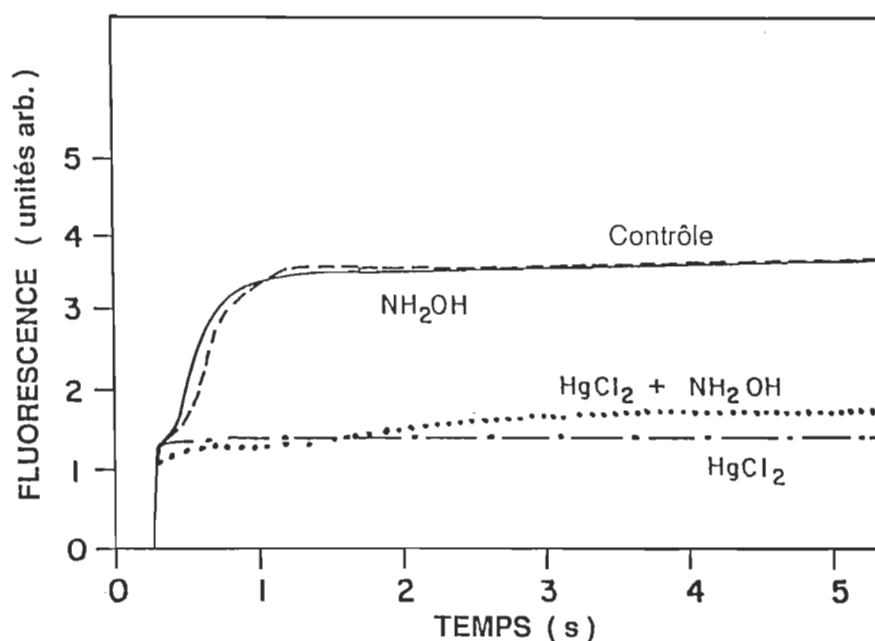


Fig.31 Courbes d'induction de fluorescence mesurées chez des thylacoïdes intacts ou traités avec différents additifs: NH₂OH 10 mM, HgCl₂ 50uM ou NH₂OH 10 mM + HgCl₂ 50 uM

Pour obtenir une meilleure compréhension des effets du mercure sur le transport d'électrons dans le PSII, l'effet du mercure sur le changement électrochromique "C-550" a été mesuré. Ce changement d'absorbance est produit par une molécule de Phéo subissant le champ électrique présent dans le centre réactionnel du PSII. Ce champ électrique résulte de l'accumulation de charges négatives au niveau de l'accepteur Q_A (van Gorkom, 1974; Melis et Schreiber, 1979; Jursinic et Dennenberg, 1988). Les mesures de changement d'absorbance C-550 ont été effectuées en présence de DCMU (5 μ M) et de gramicidine (0.5 μ M) afin d'éliminer les contributions possibles au changement d'absorbance C-550 causées par les cyt b-559 et f, et le P700 (Jursinic et Denneberg, 1988). Tout d'abord, les résultats montrent que le mercure inhibe seulement 30% du changement d'absorbance mesuré entre 540 et 550 nm ($A_{540} - A_{550}$) chez les thylacoïdes incubés à l'obscurité pendant 15 min en présence de $HgCl_2$ 100 μ M (Fig.32). Ceci indique que la photochimie primaire au niveau du centre réactionnel du PSII est peu affectée par le mercure. Cette observation contraste avec les fortes inhibitions causées par le mercure sur la fluorescence variable (Fig.29) et le dégagement d'oxygène (Fig.30). Ainsi, en présence de mercure, l'activité photochimique primaire du centre réactionnel du PSII ne peut générer le transport d'électrons linéaire impliqué dans la photolyse de l'eau et la fluorescence variable. Une telle situation pourrait être expliquée par la présence d'un transport cyclique d'électrons autour de P680.

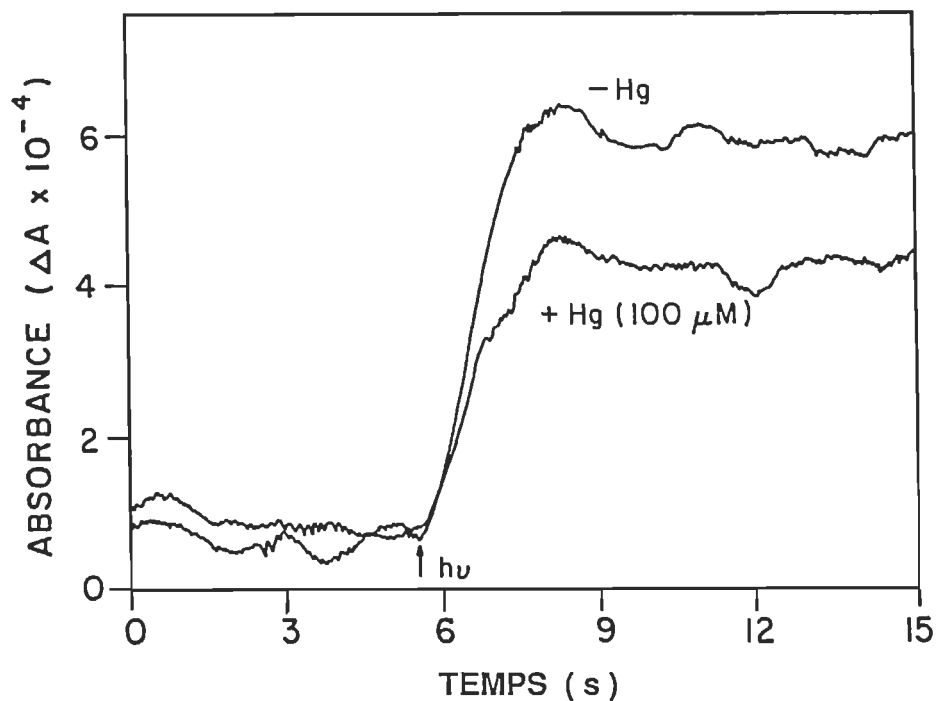


Fig.32 Cinétiques du changement électrochromique C-550 mesurées entre 540-550 nm, obtenues chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 minutes à l'obscurité en présence de 0 et 100 μM HgCl_2 , 0.5 mM FeCN , 5 μM DCMU et 0.5 μM Gramicidine.

Pour vérifier la possibilité d'un transport cyclique d'électrons autour du PSII induit par la présence de mercure, j'ai mesuré la photoréduction du cyt b-559 en présence et en absence de mercure. L'importance et les fonctions possibles du cyt b-559 au niveau du PSII ont déjà été discutées à la section 1.2.1. L'idée la plus répandue est que le cyt b-599 est impliqué dans le transport cyclique d'électrons autour du PSII (Bendall, 1982). Ce transport cyclique serait stimulé par l'absence d'accumulation de protons dans le lumen des

thylacoïdes (McCauley *et al.*, 1987; Arnon et Tang, 1988) et/ou stimulé lorsque le transport d'électrons sur le côté oxydant du PSII est inhibé (Heber *et al.*, 1979). Suite à l'illumination des thylacoïdes non-inhibés, le cyt b-559 se fait réduire par les PQ. Cette réduction est communément observée par une augmentation de la différence d'absorbance entre 559 et 570 nm, soit $A_{559} - A_{570}$. La contribution des cytochrome f et b563 au niveau signal observé est considérée comme négligeable (Tsujimoto et Arnon, 1985). Nos résultats indiquent clairement que le mercure (100 μM) empêche presque complètement la photoréduction du cyt b-559 (Fig.33). Pour vérifier si cette inhibition serait attribuée à une dégradation du cyt b-559, l'effet du mercure sur la proportion entre les cyt b-559 HP et LP a été mesuré (Fig.34A et B). Il

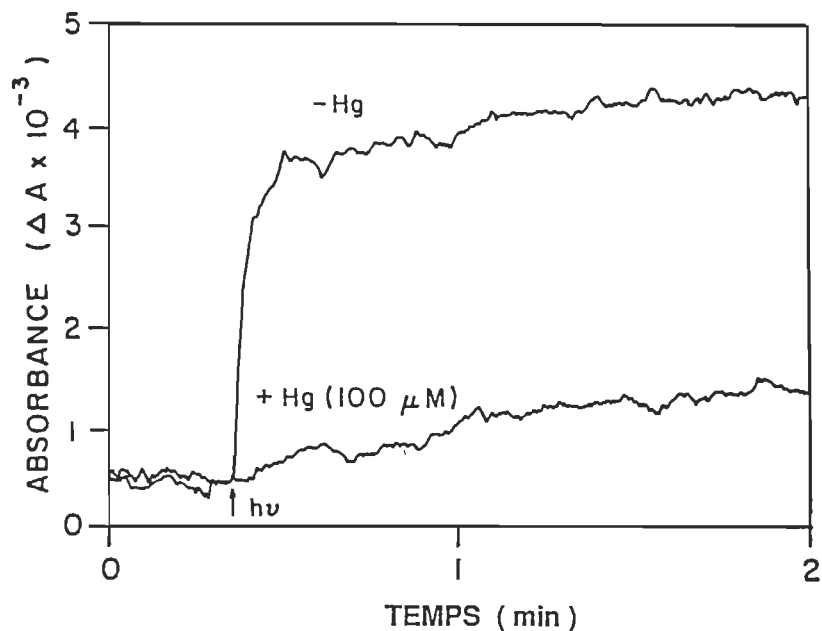


Fig.33 Phtoréduction du cyt b-559 chez des thylacoïdes après 15 minutes d'incubation à l'obscurité en présence de 2 mM FeCN et de 0 ou 100 μM HgCl₂.

est admis que les modifications de l'environnement nécessaire à l'intégrité du cyt b-559 abaissent le rapport cyt b-559 HP/LP (Cramer et Whitmarsh, 1977; Butler et Matsuda, 1983). Le cyt b-559 HP possède un haut potentiel d'oxido-réduction et est réductible chimiquement par l'hydroquinone ($E_m = +260\text{mV}$). Le cyt b-559 LP a un faible potentiel et n'est réductible que par un agent réducteur, tel le dithionite, ayant un potentiel moyen inférieur à 50 mV (Cramer et Withmarsh, 1977; Horton et Croze, 1977). Les résultats de la Fig.34 montrent que le mercure n'a aucun effet sur les quantités de cyt b-559 réductibles par l'hydroquinone et le dithionite. Puisque que le rapport cyt b-559 HP/LP est inchangé par le mercure, il semble donc que l'intégrité du cyt b-559 soit préservé. Cependant, il est évident que le mercure diminue le changement d'absorbance mesuré suite à l'addition de FeCN. Ceci indique que l'incubation des thylacoïdes en présence de mercure favorise l'oxydation des cyt b-559. La Fig.34C présente la différence entre le spectre mesuré chez des thylacoïdes réduits par le dithionite moins le spectre mesuré chez des thylacoïdes oxydés par le FeCN. Entre 540 et 580 nm, le maximum de différence d'absorbance entre les deux spectres se situe à 558.2 nm, confirmant l'attribution du signal observé (Fig.34A et B) au cyt b-559.

L'effet inhibiteur du mercure sur l'activité photochimique du PSII diffère des effets produits par le Triton X-100 (Bendall et al., 1971), la chaleur et le vieillissement (Wada et Arnon, 1971), l'hydroxylamine (Cramer et al., 1971; Horton

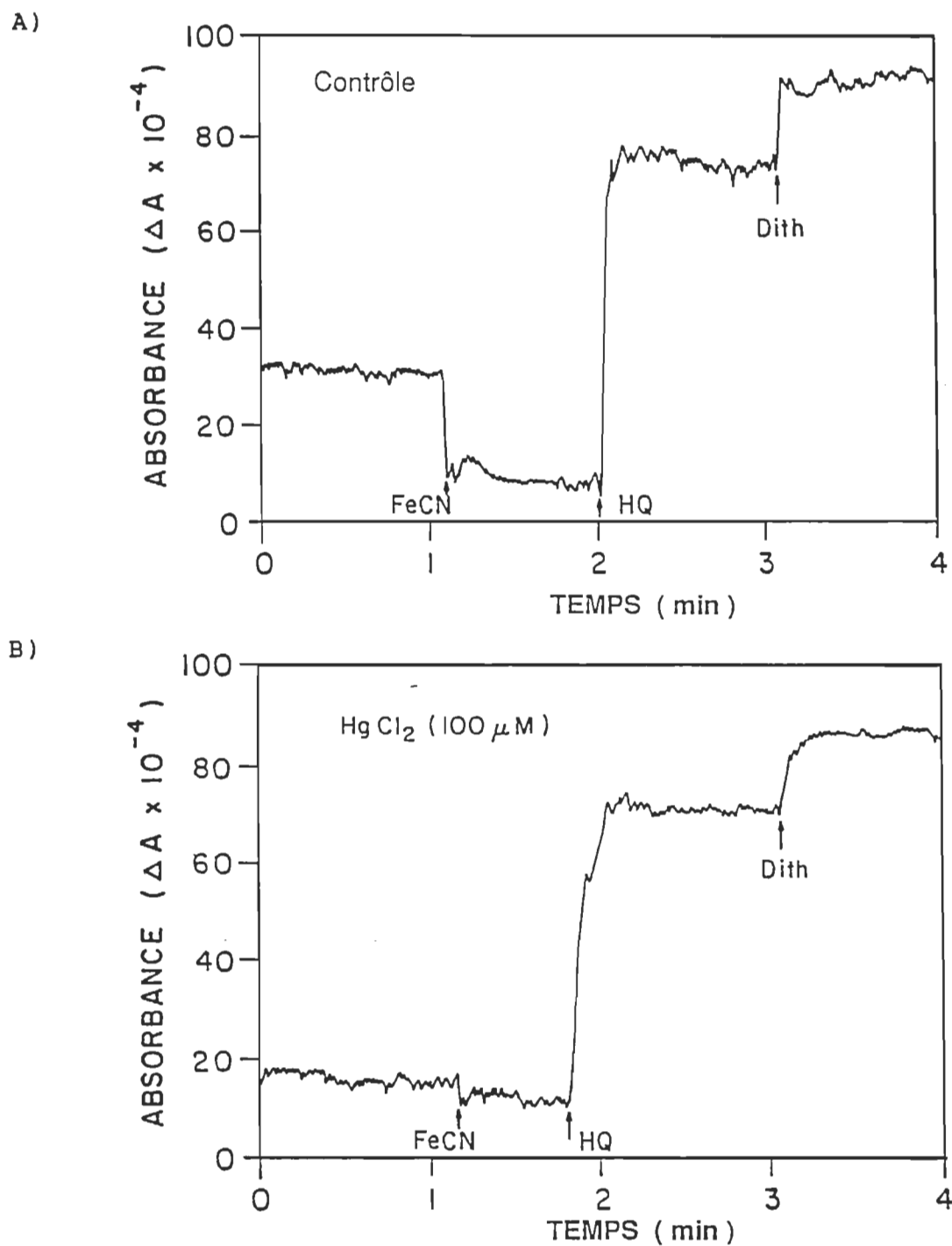


Fig.34 Caractérisation des états rédox du cyt b-559 chez des thylacoïdes d'orge (60 ug Chl tot/ml) incubés 15 min à l'obscurité en absence (A) et en présence (B) de 100 μM HgCl₂.

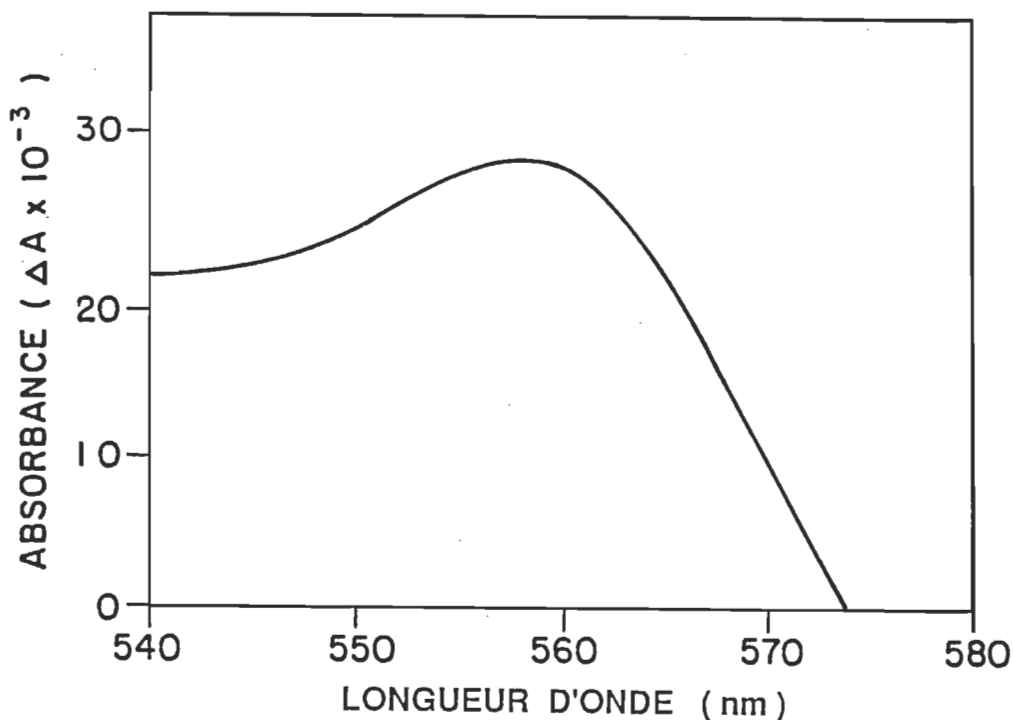


Fig.34 (suite) C) Différence entre le spectre mesuré entre 540 et 580 nm chez des thylacoïdes réduits par le dithionite moins le spectre mesuré chez des thylacoïdes oxydés par le FeCN. Les concentrations utilisées sont 2 mM pour le FeCN, 4 mM pour le HQ et un excès de dithionite.

et Croze, 1977) et le FCCP. Ces différents traitements affectent l'intégrité des PSII et provoquent la conversion à l'obscurité des cyt b-559 HP en cyt b-559 LP. Considérant que la photochimie primaire du centre réactionnel est peu affectée par le mercure (Fig.32), je peux affirmer à partir de mes résultats que le mercure provoque une augmentation du taux de photooxydation du cyt b-559 par le centre réactionnel. En fait, le cyt b-559 court-circuite l'activité des PSII (fluorescence et dégagement d'oxygène) en fournissant au centre réactionnel les électrons nécessaires à la photochimie

primaire du PSII. Chez les thylacoïdes inhibés par le mercure, un tel transport d'électrons serait une alternative nécessaire pour: 1) éviter la présence du centre réactionnel dans un état oxydé ($P680^+$) favorisant la photoinhibition et la peroxydation des lipides membranaires (Bendall, 1982; Theg et al., 1986) et/ou 2) permettre une certaine accumulation de protons via les PQ dans le lumen des thylacoïdes nécessaires à une production d'ATP (Arnon et Tang, 1988). Ces différentes fonctions du cyt b-559 pourraient constituer la base des mécanismes physiologiques de défense et de résistance contre l'effet inhibiteur du mercure dans des conditions in vivo.

3.5 Caractérisation de l'inhibition de l'activité du PSII par le cuivre chez *Dunaliella tertiolecta*

L'état actuel de la recherche sur les effets inhibiteurs du cuivre sur le transport d'électrons photosynthétiques a été présenté à la section 1.4. Les travaux récents portant sur le site et le mode d'action du cuivre sur le transport d'électrons dans le PSII localisaient l'effet du cuivre au niveau du centre réactionnel du PSII (Hsu et Lee, 1988; Renganathan et Bose, 1989). Cependant, Mohanty et al. (1989) attribuaient l'effet du cuivre à une modification quelconque du site Q_B . De plus, Hsu et Lee (1988) suggéraient à partir de la relative insensibilité de la montée O-I de la fluorescence que le cuivre inhibait complètement une partie des PSII. Cependant, les limites de cette interprétation ont déjà été discutées à

la section 1.4. L'objectif de cette section est d'élucider le site et le mode d'action du cuivre sur le PSII.

L'effet du cuivre sur le transport d'électrons dans le PSII a été étudié par l'émission de la fluorescence par les algues incubées en présence de cuivre. La Fig.35 montre l'induction de fluorescence chez les cellules de D.tertiolecta mesurées après 15 min d'incubation en présence de différentes concentrations de cuivre. Lorsque la concentration de cuivre augmentait, l'intensité de la fluorescence au niveau P diminuait, tandis que le niveau F_0 demeurait inchangé. La même atténuation de la fluorescence variable par le cuivre était observée en absence et en présence de DCMU. La baisse de fluorescence en présence de DCMU suggère que l'effet étudié

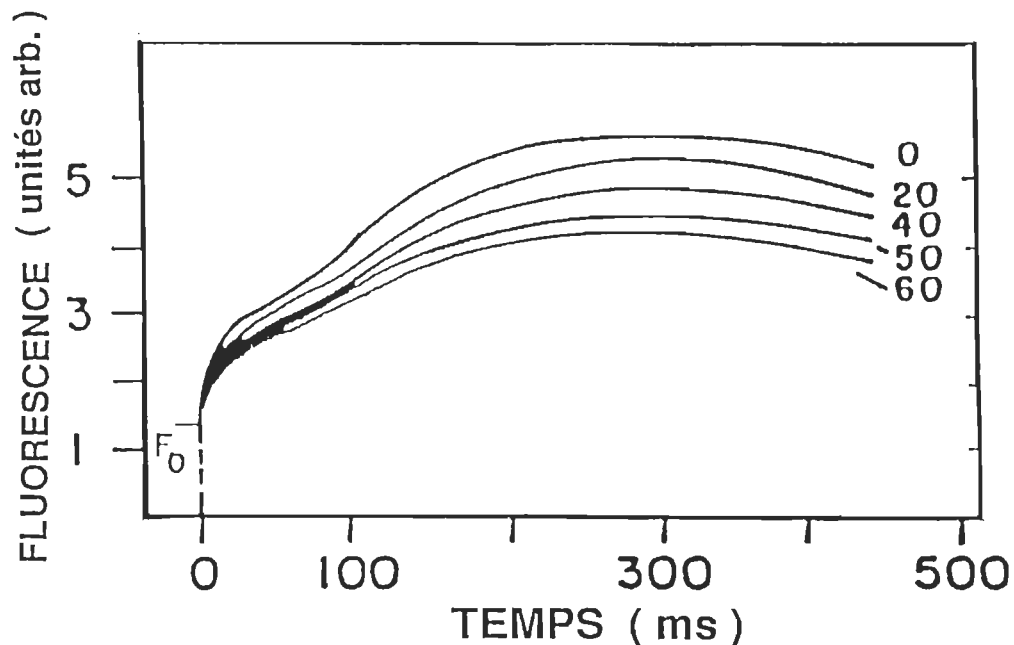


Fig.35 Courbes d'induction de fluorescence émises par les cellules de D.tertiolecta incubées pendant 15 min en présence de différentes concentrations de CuSO_4 (les numéros correspondent à la concentration de CuSO_4 en μM).

est attribuable à une inhibition du PSII par le cuivre sur le coté oxydant du PSII (Butler, 1972; Popovic *et al.*, 1988).

La relation entre l'intensité de la fluorescence variable (mesurée en présence de DCMU) en fonction de la concentration de cuivre dans le milieu d'incubation est présentée à la Fig.36A. La fluorescence est rapidement diminuée jusqu'à 40 μM CuSO_4 et tend vers un minimum de 70% de F_{vmax} à environ 70 μM . Puisque le niveau F_0 n'était pas modifié par le cuivre contrairement à la fluorescence variable (Fig.35), le rendement photochimique de la fluorescence, mesuré par $1-(F_0/F_{\text{max}})$ estimant le rendement quantique de la photochimie

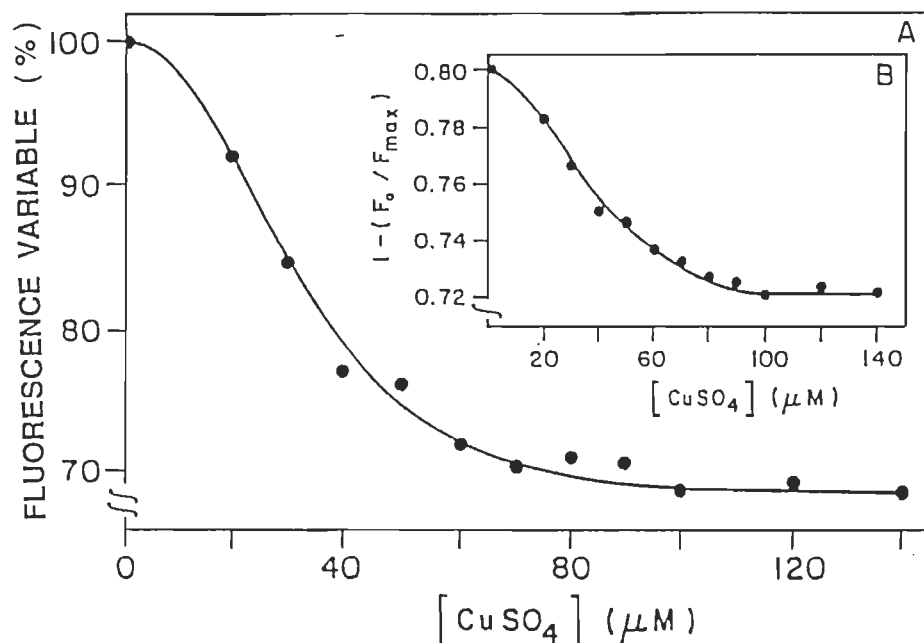


Fig.36 A) Pourcentages des intensités de la fluorescence variable maximale mesurée en présence de DCMU en fonction de la concentration de CuSO_4 . B) Rendement photochimique de la fluorescence mesuré par $1-(F_0/F_{\text{max}})$ en fonction de la concentration de CuSO_4 .

du PSII (Malkin et al., 1981), est diminué par le cuivre (Fig.36B).

Dans le but de localiser le site d'inhibition du cuivre au niveau du PSII, l'effet du cuivre sur la fluorescence a été mesuré en présence de DCMU lorsque le donneur d'électrons au centre réactionnel du PSII était l'eau ou l'hydroxylamine (Fig.37). Tel que mentionné à la section 3.1 (voir Fig.17), l'hydroxylamine (10 mM) inhibait complètement le dégagement d'oxygène chez D.tertiolecta (résultats non présentés). A cette concentration, l'hydroxylamine agit comme donneur d'électrons en réduisant le donneur primaire Z du PSII (Cheniae et Martin, 1971). Ainsi, une intensité équivalente de

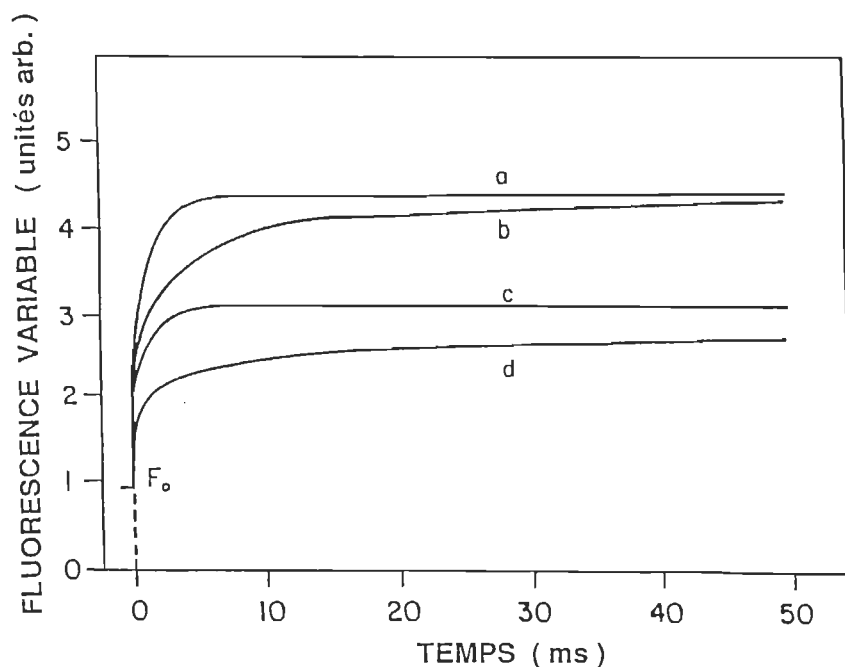


Fig.37 Courbes d'induction de fluorescence mesurées en présence de DCMU chez des algues traitées avec différents additifs: A) Contrôle, B) NH₂OH 10 mM, C) CuSO₄ 70 µM et D) NH₂OH 10 mM + CuSO₄ 70 µM.

fluorescence était mesurée lorsque l'eau et l'hydroxylamine servaient comme donneur d'électrons (courbes a et b). Fait important, le cuivre diminue l'intensité de la fluorescence lorsque l'eau et l'hydroxylamine agissaient en tant que donneur d'électrons (courbes c et d). Mes résultats confirment que le site d'inhibition du cuivre est localisé au niveau du coté oxydant du PSII, après le site de donation d'électrons de l'hydroxylamine, c'est-à-dire très près du centre réactionnel du PSII (Shioi et al., 1978; Hsu et Lee, 1988; Mohanty et al., 1989). Cependant, mes résultats réfutent les affirmations de Vierke et Struckmeier (1978) et de Bohner et al. (1981), qui situaient l'effet inhibiteur du cuivre au niveau du complexe de dégagement d'oxygène.

Dans le but de vérifier si l'inhibition du PSII par le cuivre est de type tout-ou-rien, le taux de photoréduction de Q_A et l'aire complémentaire ont été mesurés en présence de DCMU chez les cellules de D.tertiolecta traitées avec différentes concentrations de $CuSO_4$. Le taux de photoréduction de Q_A a été estimé par la méthode de Manodori et Melis (1986), utilisant la pente K des droites semilogarithmiques de $\ln[F_{max}-F(t)]$ en fonction du temps (voir section 2.2.2, Fig.12). Mes résultats montrent que le cuivre n'affecte pas le taux de photoréduction de Q_A associés aux centres réactionnels du PSII (Fig.38). Cependant, l'activité photochimique des PSII estimée par l'aire complémentaire mesurée en présence de DCMU est diminuée suite à l'inhibition causée par le cuivre. Lorsque le taux de photoréduction de Q_A n'est pas

affecté, l'aire complémentaire mesurée en présence de DCMU est proportionnelle à la quantité de centres réactionnels photochimiquement actifs (Malkin *et al.*, 1981; Lavorel *et al.*, 1986). Considérant que le taux de photoréduction de Q_A n'est pas affecté et que le rendement photochimique du PSII ainsi que l'aire complémentaire sont diminués suite à l'effet du cuivre, nous pouvons donc conclure qu'une partie des centres réactionnels du PSII sont totalement inactivés par le cuivre. Ces résultats confirment de façon claire la suggestion de Hsu et Lee (1988), voulant que le cuivre bloque complètement l'activité d'une fraction de la population des PSII sans affecter l'autre part de la population.

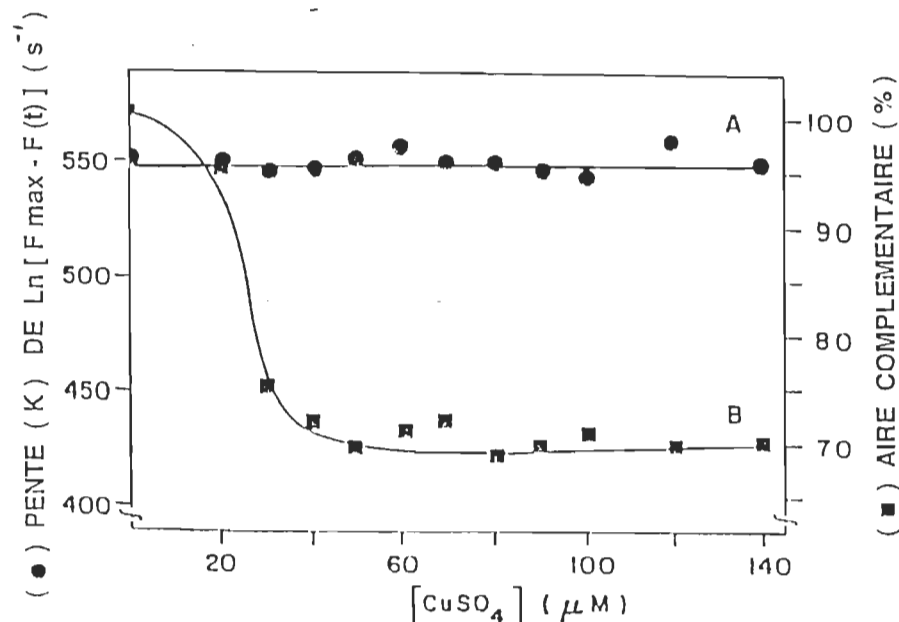


Fig.38 Taux de photoréduction de Q_A évalué en présence de DCMU par la pente de $\ln [F_{\max} - F(t)]$ en fonction du temps (●) et aire complémentaire mesurée en présence de DCMU (■) chez des cellules d'algues incubées avec différentes concentrations de CuSO_4 .

3.6 Interactions du cuivre sur le transport d'électrons et le cytochrome b-559 chez les thylacoïdes d'orge

L'ensemble des observations concernant les effets inhibiteurs du cuivre sur le PSII suggère que le site d'inhibition se trouve très près du centre réactionnel du PSII (sections 1.4 et 3.5). Les résultats récents de Hsu et Lee (1988) et de Renganathan et Bose (1989), situant cette inhibition entre P680 et la Phéo, appuient fortement cette suggestion. Cependant, la présence d'un seul site d'inhibition bien défini au niveau du centre réactionnel est difficile à concevoir puisque 1) le manganèse et le DPC restaurent partiellement sous certaines conditions l'inhibition du PSII causée par le cuivre (Habermann, 1969; Cedeno-Maldonado et al., 1972; Shioi et al., 1978; Samuelsson et Oquist, 1980) et 2) la présence du DCMU renverse partiellement l'effet du cuivre sur la fluorescence variable (Shioi et al., 1978; Hsu et Lee, 1988). Concernant ce dernier point, Mohanty et al. (1989) suggéraient que le cuivre causait des modifications structurales au niveau du site Q_A accompagnées d'une baisse de la fluorescence variable. La nature de l'interaction du cuivre au site Q_A est totalement inconnue. Cependant, il est important de mentionner que Kyle et al. (1984) observaient une altération du site Q_A (due à la photoinhibition) accompagnée d'une baisse de la fluorescence. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène était l'induction d'un transport cyclique d'électrons autour de P680 avec l'implication du cytochrome b-559.

Dans ce contexte, le but de cette section est de mieux comprendre l'effet inhibiteur du cuivre sur le transport d'électrons au niveau du centre réactionnel et de vérifier l'interaction possible du cuivre avec le cytochrome b-559.

L'effet du cuivre sur la fluorescence variable des thylacoïdes d'orge a été mesuré en absence et en présence de 5 μM DCMU (Fig.39). La fluorescence variable diminue rapidement lorsque la concentration de CuSO_4 augmente jusqu'à 20 μM et tend vers un minimum de 25% par rapport au contrôle à 30 μM Cu^{2+} . A cette concentration de cuivre, la présence de DCMU

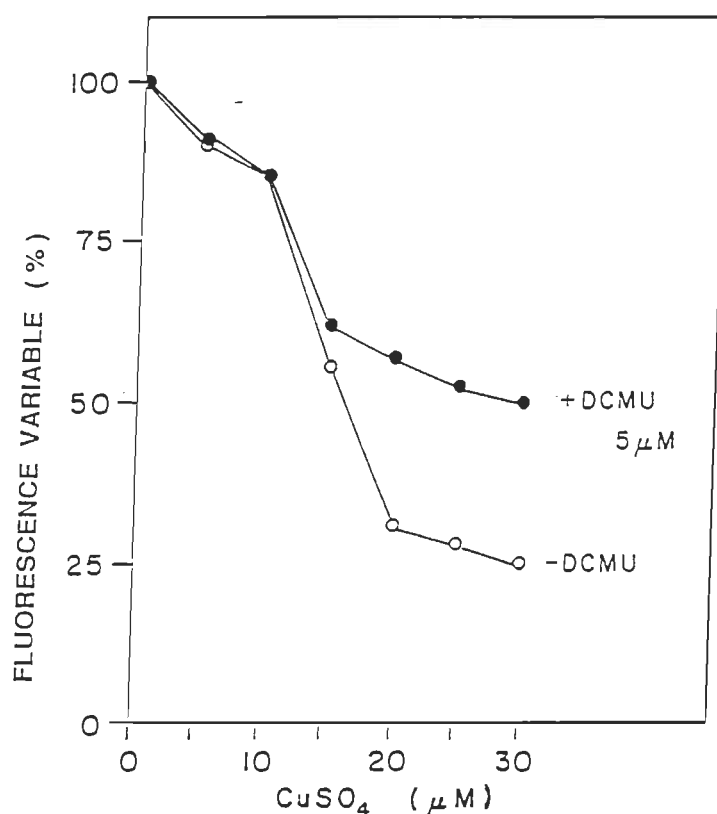


Fig.39 Intensités de la fluorescence variable chez des thylacoïdes d'orge mesurées en absence et en présence de DCMU en fonction de la concentration de CuSO_4 .

(5uM) restaure environ 25% de la fluorescence.

Plusieurs auteurs ont aussi observé un maximum de toxicité du cuivre dans les environs de 30 à 50 uM Cu^{2+} (Hsu et Lee, 1988; Mohanty et al., 1989; Renganathan et Bose, 1989; voir aussi Fig.36). Puisqu'il est admis que seulement l'ion cuivrique (Cu^{2+}) est responsable de l'effet inhibiteur du cuivre sur l'activité des PSII (Vierke et Struckmeier, 1978), il est donc important d'étudier le comportement de l'ion cuivrique en solution. En effet, celui-ci réagit avec plusieurs autres ions tels les ions hydroxyls, phosphate et acétate pour former des sels insolubles ne pouvant interagir avec le PSII. La formation de ce précipité dépend de la quantité d'ion cuivrique en solution et du contre-ion impliqué dans la réaction (Cotton et Wilkinson, 1988). J'ai utilisé une électrode spécifique au cuivre (qui ne répond qu'à la présence de Cu^{2+}) pour vérifier le comportement de l'ion cuivrique en solution. La Fig.40 montre la courbe du potentiel de l'électrode spécifique au cuivre en fonction de la concentration de CuSO_4 ajouté au milieu de resuspension des thylacoïdes (pH 7.5). Nous observons que la concentration de Cu^{2+} en solution n'augmente plus linéairement à partir de 20 uM et tend vers un maximum à 30 uM CuSO_4 . Ceci indique que la précipitation du Cu^{2+} débute à environ 30 uM. La similitude entre cette courbe et les courbes de la Fig.39 est évidente et démontre clairement que l'inhibition de la fluorescence variable par le cuivre est limitée par la précipitation du Cu^{2+} . Ceci explique qu'au-delà de 30 uM, l'addition de cuivre est très peu efficace à

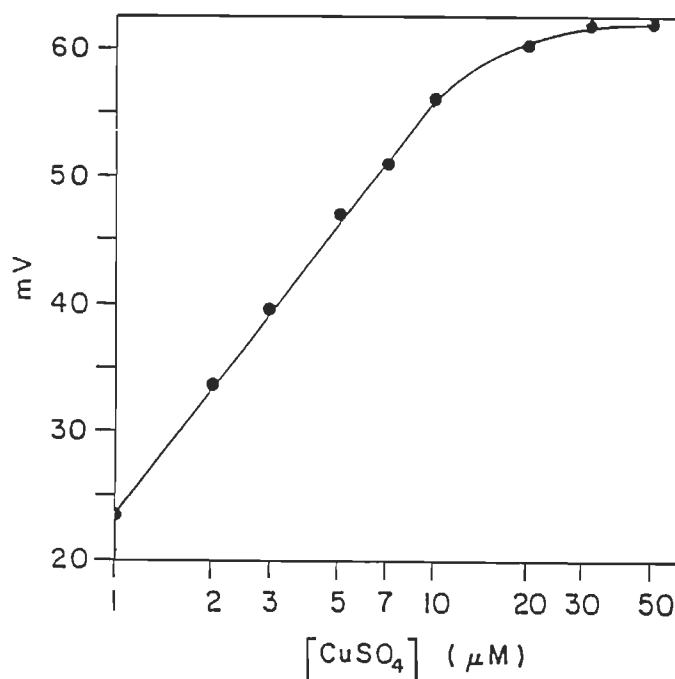


Fig.40 Réponse de l'électrode spécifique au cuivre "modèle Orion 94-29" à la présence de différentes concentrations de CuSO₄ dans le milieu de resuspension des thylacoïdes (pH 7.5)

à inhiber davantage le PSII. Mes résultats démontrent qu'aucune interprétation basée sur l'inhibition du PSII en fonction de la concentration de cuivre ne devrait être faite en utilisant des concentrations supérieures à 20 uM de Cu²⁺. C'est la première fois que cette observation est faite dans les études portant sur les effets inhibiteurs du cuivre au niveau du PSII. Ceci invalide donc une partie des résultats de Rengenathan et Bose (1989), qui associaient aux PSIIb et/ou PSII de type non-Q_B la portion (30%) de la fluorescence variable insensible à l'effet inhibiteur du cuivre au-delà de 50 uM CuCl₂.

Dans le but de mieux caractériser la restauration partiel-

le de la fluorescence atténuée par le cuivre suite à l'addition de DCMU, les intensités relatives de la fluorescence variable des thylacoïdes inhibés ou non par 30 μM CuSO_4 ont été mesurées en fonction de la concentration de DCMU (Fig.41). Nous pouvons constater que pour 30 μM CuSO_4 , la restauration maximale de la fluorescence variable est atteinte à 3 μM DCMU et diminue légèrement au-delà de 5 μM . Cette baisse de la fluorescence variable après 5 μM DCMU reste difficile à expliquer et suggère une interaction complexe du cuivre et du DCMU au site Q_B . La concentration de DCMU requise pour restaurer le maximum de fluorescence variable atténuée par le cuivre correspond approximativement à la concentration de DCMU nécessaire pour bloquer complètement le transport d'électrons au site Q_B (Tresbt, 1981). De plus, il est important de noter

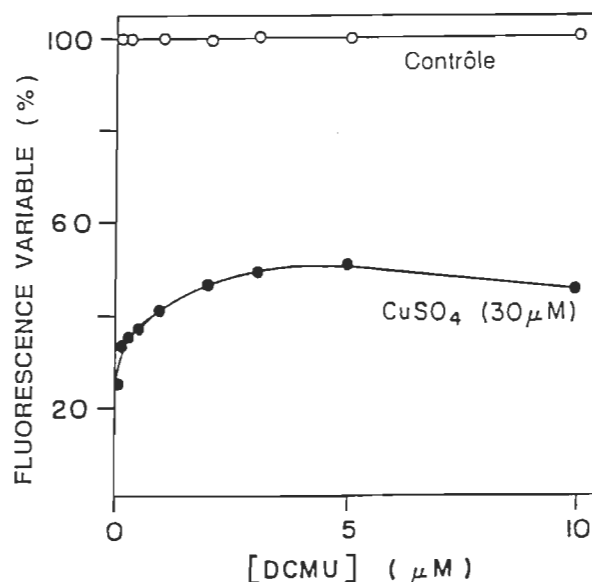


Fig.41 Pourcentages des intensités de fluorescence variable des thylacoïdes d'orge incubés en présence de 0 et 30 μM CuSO_4 en fonction de la concentration en DCMU.

qu'en absence de cuivre, le DCMU n'avait aucun effet sur l'intensité de la fluorescence variable pour les concentrations utilisées dans cette expérience (entre 0 et 10 μM). Ceci indique donc que la restauration par le DCMU de la fluorescence variable atténuée par le cuivre résulte uniquement d'une interaction entre ces deux inhibiteurs au niveau du transport d'électrons associé au PSII.

Afin de confirmer cette dernière affirmation, j'ai vérifié si la restauration par le DCMU de la fluorescence atténuée par le cuivre est un phénomène limité au PSII ou causé par le blocage d'un "drain" d'électrons localisé au-delà de Q_B . L'effet du cuivre sur les intensités de la fluorescence variable chez des thylacoïdes a été mesuré en présence et en absence de DBMIB d'une part et d'autre part, de l'enzyme glucose oxydase. Le DBMIB bloque l'oxydation des PQ au niveau du complexe cyt b/f (Trebst, 1981). L'utilisation de la glucose oxydase en présence de glucose enlève tout l'oxygène dissous dans la solution pouvant agir comme accepteur d'électrons notamment au niveau des PQ (Popovic et al., 1984). Les résultats présentés au tableau 2 indiquent que l'effet du cuivre (30 μM) sur la fluorescence est le même en absence et en présence de DBMIB (0.5 μM) et de glucose oxydase (3.8 unités/ml + 50 mM glucose). Par conséquent, nous pouvons affirmer avec certitude que la restauration par le DCMU de la fluorescence atténuée par le cuivre est un phénomène limité uniquement au PSII. Ce phénomène encore inexpliqué demande à être étudié car il pourrait fournir des indications précieu-

Tableau 2. Effet du CuSO_4 (30 μM) sur les intensités de la fluorescence variable mesurées en absence et en présence de DBMIB (0.5 μM) et de glucose oxydase (3.8 unités/ml + 50 mM glucose)

traitements	Fvp (%)
Contrôle	100
CuSO_4	25
DBMIB	82
DBMIB + CuSO_4	26
glucose oxydase	62
glucose oxydase + CuSO_4	25

ses sur l'interaction du cuivre au niveau du centre réactionnel.

Afin de mieux comprendre les effets du cuivre sur le transport d'électrons au niveau du centre réactionnel, l'effet du cuivre sur le changement électrochromique "C-550" a été mesuré chez les thylacoïdes d'orge. Tel que déjà discuté à la section 3.4, ce changement d'absorbance est relié aux modifications d'une molécule de Phéo subissant le champs électrique produit par le centre réactionnel du PSII (van Gorkom, 1974; Melis et Schreiber, 1979; Jursinic et Dennenberg 1988). Les résultats de la Fig.42 indiquent que le cuivre même à une concentration de 50 μM n'affecte pas significative-

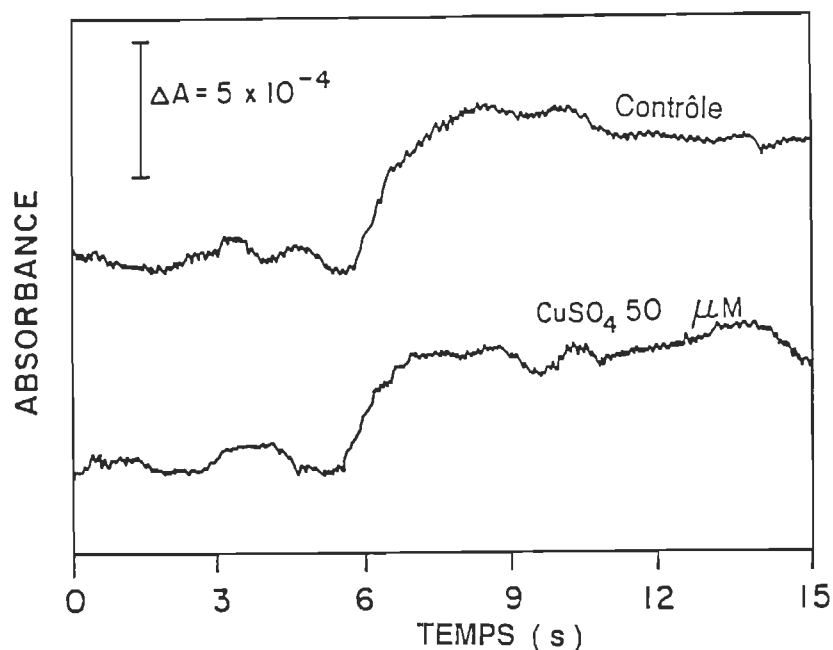


Fig.42 Cinétiques du changement d'absorbance C-550 (ΔA 540-550 nm) induit par une illumination continue et mesuré en présence de FeCN 0.5 mM, DCMU 5 μ M et de gramicidine 0.5 μ M ainsi qu'en absence et en présence de CuSO₄ 50 μ M.

ment la différence d'absorbance mesurée entre 540 et 550 nm suite à l'illumination des thylacoïdes (voir section Matériels et Méthodes). Ceci indique clairement que l'effet du cuivre sur la fluorescence ne peut être attribué à une inhibition de la photochimie primaire au niveau du centre réactionnel du PSII, tel que proposée par Hsu et Lee (1988) et Renganathan et Bose (1989). Aussi, il est important de noter que les mesures de changement d'absorbance C-550 ont été faites en présence de FeCN (0.5 mM), de DCMU (5 μ M) et de gramicidine (0.5 μ M) afin d'éliminer les contributions possibles au changement d'absorbance C-550 causées par les cytochromes b-559 et f, et le P700 (Jursinic et Denneberg, 1988). La différence mesurée de 5×10^{-4} unités d'absorbance est pratiquement identique à celles

mesurées antérieurement (Melis et Schreiber, 1979; Jursinic et Dennenberg, 1988). Ceci indique donc que la différence d'absorbance mesurée est due uniquement au changement électrochromique induit par les réactions photochimiques au niveau du centre réactionnel de PSII.

Les résultats précédents montrant l'absence d'effets inhibiteurs du cuivre sur le changement électrochromique C-550 semblent infirmer la possibilité d'un effet du cuivre au niveau du centre réactionnel du PSII (Hsu et Lee, 1988; Rengenathan et Bose, 1989). Cependant, une interaction du cuivre avec le cyt b-559, une composante intimement liée au centre réactionnel (Nanba et Satoh, 1987; Rolfe et Bendall, 1989), pourrait expliquer cette apparente contradiction. Considérant les résultats démontrant l'induction d'un transport cyclique d'électrons autour de P680 suite à l'effet du mercure chez des thylacoïdes d'orge (section 3.4), nous avons tout d'abord étudié l'effet du cuivre sur la photoréduction du cyt b-559. Les résultats de la Fig.43 indiquent clairement que le cuivre (100 μM pour une concentration de chlorophylle totale de 60 $\mu\text{g/ml}$) n'empêche pas la photoréduction du cyt b-559. Au contraire, l'incubation à l'obscurité des thylacoïdes en présence de 100 μM CuSO_4 augmente significativement le changement d'absorbance observé au niveau stable obtenu après le début de l'illumination continue. En présence de cuivre, le ΔA moyen d'un échantillon de 20 mesures est de $(3.1 \pm 0.5) \times 10^{-3}$ unités d'absorbance tandis qu'en absence de cuivre, le ΔA moyen d'un échantillon équivalent était $(2.5 \pm 0.3) \times$

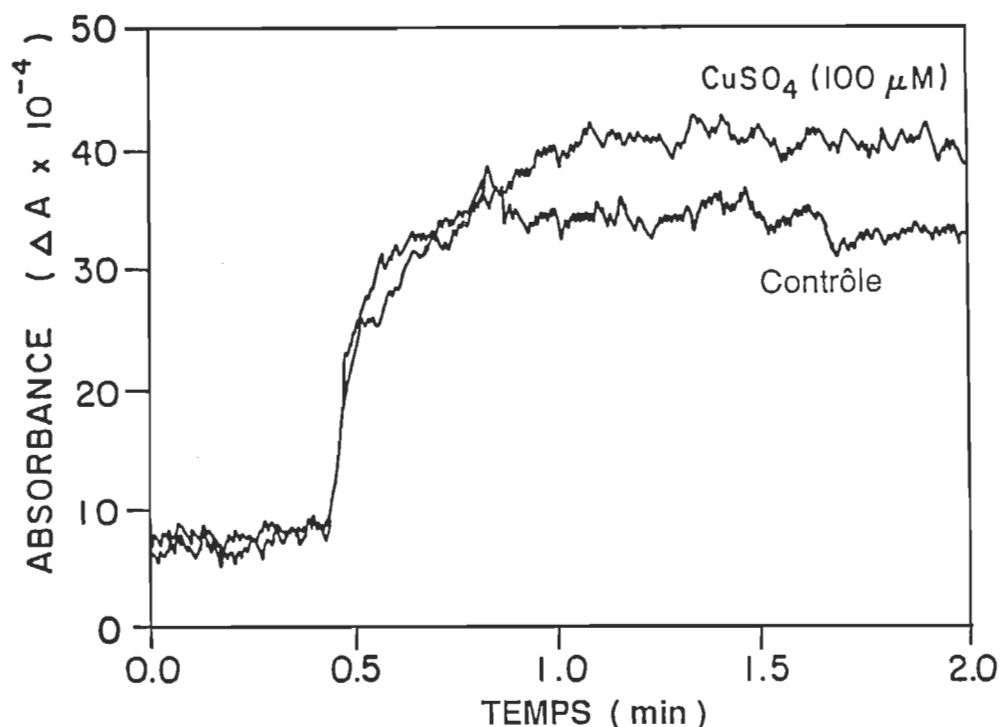


Fig.43 Cinétiques de la photoréduction du cyt b-559 chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 min à l'obscurité en présence de 2 mM FeCN et de 0 ou 100 mM CuSO₄.

10³. Cette dernière valeur est très similaire au changement d'absorbance déjà mesuré suite à la photoréduction du cyt b-559 chez des chloroplastes d'épinard (Arnon et Tang, 1988). Nos résultats excluent donc la possibilité que l'effet inhibiteur du cuivre sur l'activité des PSII soit le reflet d'un transport cyclique d'électrons autour de P680.

Cette dernière conclusion n'élimine pas une interaction possible du cuivre avec le cyt b-559. Tel que déjà indiqué à la section 1.2.1, le cyt b-559 peut exister sous deux états, HP et LP, dont les potentiels moyens d'oxydo-réduction (E_m) sont respectivement +383 et +77 mV (Horton et Croze, 1977). En fait, le cyt b-559 se comporte à la fois comme un couple rédox et comme un couple acide-base. Le cyt b-559 LP oxydé non-pro-

toné et le cyt b-559 HP réduit protoné sont les états les plus stables du cyt b-559 (Butler, 1983; Ortega et al., 1988, 1989). Il est connu que plusieurs traitements inhibant l'activité des PSII abaissent le potentiel E_m des cyt b-559. Ceci se traduit par une conversion, généralement considérée comme étant irréversible, des cyt b-559 HP en LP en conséquence d'une altération de la structure membranaire associée au PSII (Whitmarsh et Cramer, 1977; Horton et Croze, 1977). De telles modifications structurelles causées par le cuivre ont déjà été proposées par Mohanty et al. (1989) au niveau du site Q_A . Auparavant, Vierke et Struckmeier (1977) concluaient que l'inhibition de l'activité des PSII par le cuivre résultait des changements structurels de la membrane photosynthétique suite à la fixation de l'ion cuivrique sur une protéine du PSII qui ne serait pas directement impliquée dans le transport d'électrons photosynthétiques. Dans ce contexte, il était donc important d'étudier l'effet du cuivre sur les propriétés rédox du cyt b-559 afin d'identifier une interaction du cuivre au niveau du cyt b-559.

La réductibilité du cyt b-559 par l'hydroquinone ($E_m = +280$ mV) est une mesure courante pour évaluer la quantité de cyt b-559 HP ($E_m = +383$ mV). Les cyt b-559 demeurant oxydés après l'addition de l'hydroquinone (HQ) correspondent aux cyt b-559 et sont réductibles par l'addition de dithionite (Dith) (Horton et Cramer, 1977; Yamaghashi et Fork, 1987; Ortega et al., 1989). La caractérisation des états rédox du cyt b-559 en absence ou en présence de $CuSO_4$ (100 μM) est présentée à la

Fig.44. Tout d'abord, le changement d'absorbance mesuré entre 559 et 570 nm après l'addition de 2 mM ferricyanure (FeCN) est causé par l'oxydation des cyt b-559 HP demeurés réduits après la période d'incubation de 15 minutes à l'obscurité. Les résultats montrent que l'addition de FeCN (2 mM) chez les thylacoïdes non-traités au cuivre diminuait le signal de 2.3×10^{-3} unités. Ensuite, les additions successives de HQ (4 mM) et de Dith (en excès) entraîne la réduction des cyt b-559 HP puis des cyt b-559 LP. Le rapport entre les deux états obtenus, correspondant à une moyenne de dix mesures, est de 76 HP/ 24 LP pour les thylacoïdes non-traités au cuivre. Ce rapport HP/LP est légèrement supérieur à ceux obtenus par d'autres auteurs avec des thylacoïdes enrichis en PSII (Yamagishi et Fork, 1987; Ortega et al., 1989). Cette différence est attribuable aux détergents utilisés lors de l'isolation des membranes granaires (Ghanotakis et al, 1987), qui entraînent la conversion d'une partie des cyt b-559 HP en LP (Bendall et al.). Pour ce qui est des thylacoïdes incubés en présence de 100uM CuSO₄, nous constatons des différences importantes par rapport aux thylacoïdes non-traités. Premièrement, la quantité de cyt b-559 initialement réduit et oxydable par 2 mM FeCN est augmentée par un facteur de 1.4. Ceci indique que chez les thylacoïdes incubés à l'obscurité en présence de cuivre, une plus grande quantité de cyt b-559 demeure dans un état réduit. Ensuite, le rapport HP/LP ($\frac{\Delta A_{HQ} - \Delta A_{FeCN}}{\Delta A_{Dith} - \Delta A_{HQ}}$) est grandement diminué par

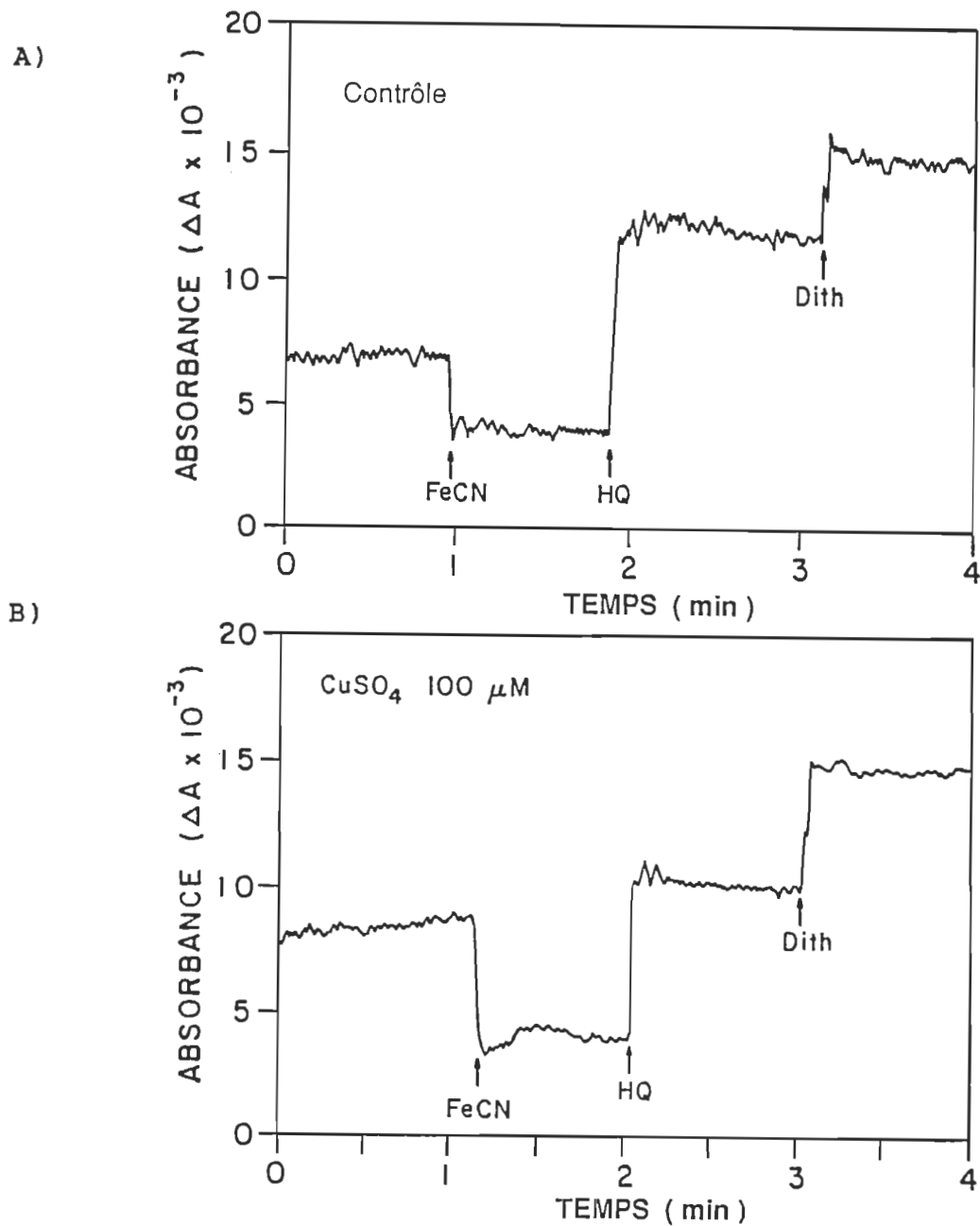


Fig.44 Caractérisation des états rédox du cytochrome b-559 chez des thylacoïdes d'orge (60 ug Chl tot/ml) incubés 15 minutes à l'obscurité en absence et en présence de 100 μM CuSO_4 . Les concentrations sont 2 mM pour le FeCN, 4 mM pour le HQ et un excès de dithionite.

le cuivre, même si le changement d'absorbance total (ΔA Dith) est inchangé. Ces résultats montrent donc qu'à l'instar de nombreux traitements affectant la structure membranaire des thylacoïdes, le cuivre entraîne une conversion des cyt b-559 HP en cyt b-559 LP. Ainsi, le cuivre diminue la quantité de cyt b-559 HP ayant un potentiel rédox égal ou supérieur à 260 mV (Horton et Croze, 1977).

Cette dernière affirmation est confirmée par la différence entre le spectre mesuré chez des thylacoïdes incubés pendant 15 minutes à l'obscurité en présence de 100 μM CuSO_4 moins le spectre correspondant mesuré en absence de cuivre (Fig.45). D'après la position du pic (558.2 nm), nous pouvons

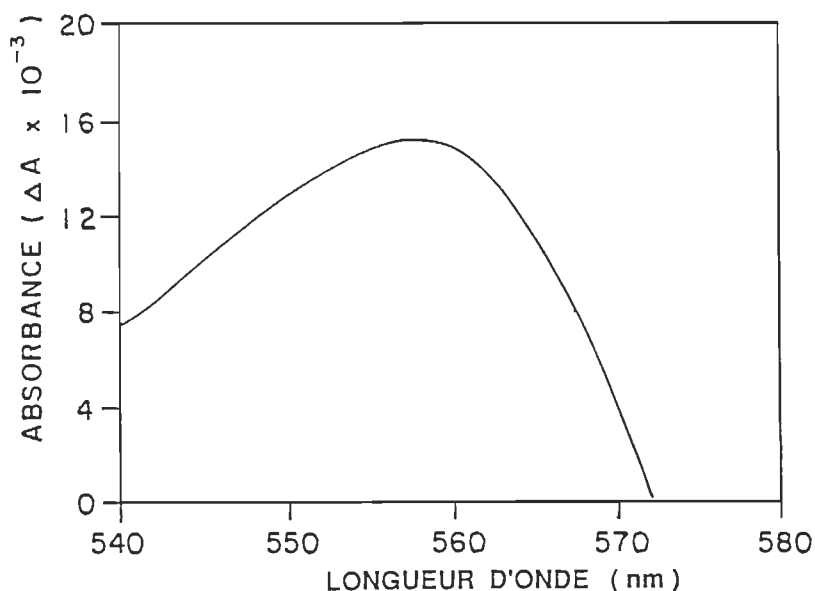


Fig.45 Différence entre les spectres mesurés de 540 à 580 nm chez des thylacoïdes d'orge incubés pendant 15 minutes à l'obscurité en présence de 100 μM CuSO_4 moins le spectre mesuré en absence de cuivre. 2mM FeCN ont été ajoutés 1 minute avant les mesures.

affirmer clairement que le cuivre a un effet réducteur sur l'ensemble des cyt b-559. Puisque ces mesures ont été effectuées en présence de 2 mM FeCN, les effets du cuivre sur la réduction du cyt b-559 ne peuvent être expliqués par une modification du potentiel redox de la solution de resuspension causée par le cuivre. En fait, ces résultats supportent l'idée d'un effet conformationnel du cuivre sur l'environnement immédiat du cyt b-559.

L'augmentation de la l'amplitude de la photoréduction du cyt b-559 causée par le cuivre (Fig.43) malgré la baisse de la quantité de cyt b-559 HP à l'obscurité (Fig.44) sont des observations difficiles à concilier. Dans le but de mieux comprendre les phénomènes responsables de ce comportement, les mesures de photoréduction ont été combinées aux procédures normales de caractérisation des états redox du cyt b-559. Ainsi, après avoir atteint l'amplitude maximale du changement d'absorbance causé par la photoréduction, l'hydroquinone et le dithionite étaient alors succesivement ajoutés. Par cette procédure originale, il a été possible d'observer la fraction des cyt b-559 HP réductibles par la lumière. A la Fig.46, nous constatons qu'en absence de cuivre, 26% des cyt b-559 HP des thylacoïdes intacts sont réductibles par la lumière. Ce pourcentage de cyt b-559 photoréductibles atteint 40% chez les thylacoïdes incubés en présence de 100 μ M CuSO₄. De plus, l'illumination des thylacoïdes inhibés par le cuivre restaurait le rapport HP/LP à des valeurs proches de celles obtenues pour les thylacoïdes intacts. Cette conversion par la

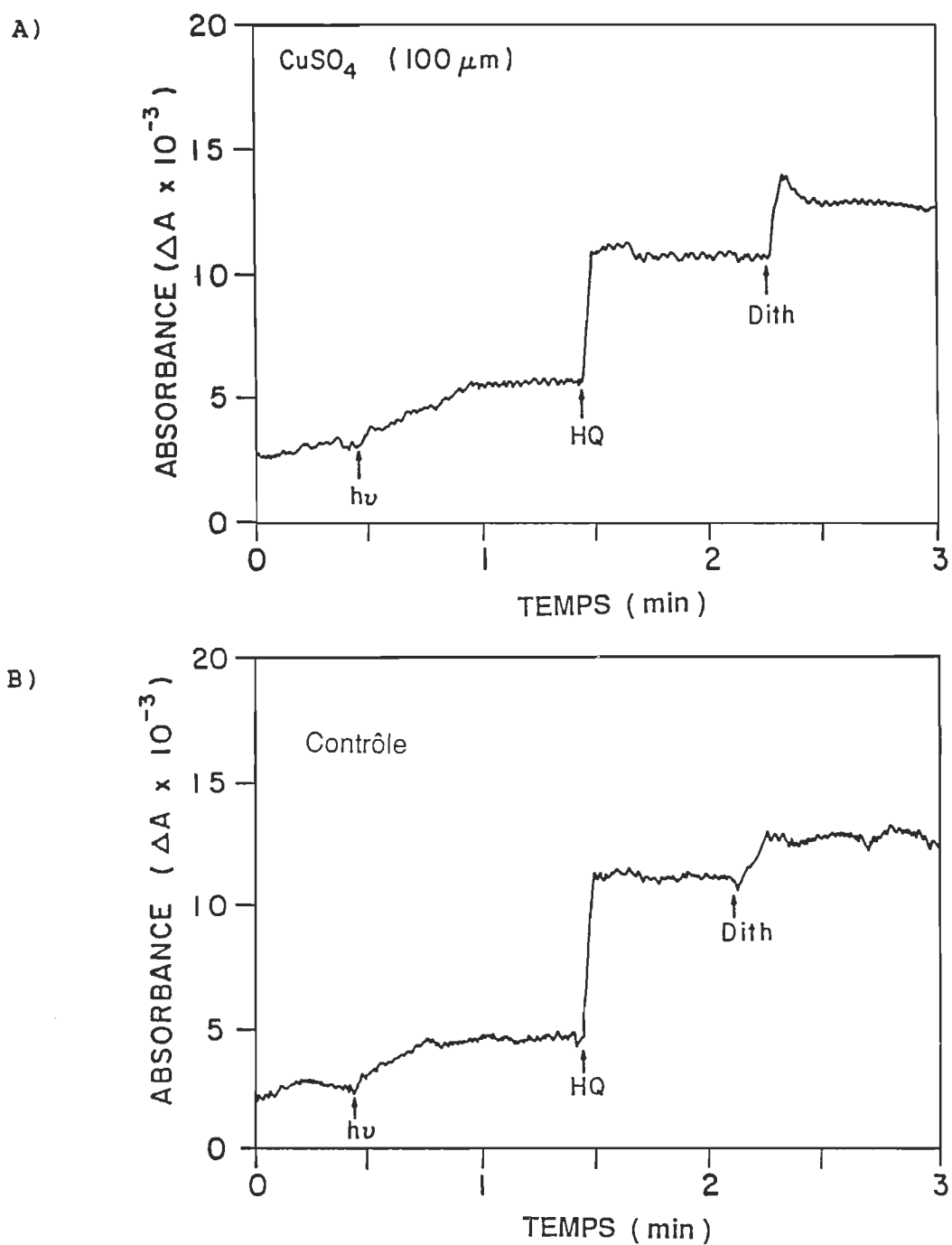


Fig.46 Photoréduction et caractérisation des états rédox du cyt b-559 chez des thylacoïdes d'orge (60 ug Chl tot/ml) incubés 15 min à l'obscurité en absence et en présence de 100 uM CuSO₄. Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées à la Fig.44.

lumière des cyt b-559 LP en HP chez les thylacoïdes inhibés par le cuivre indique la photoréduction d'une partie des cyt b-559 LP suivie de leur protonation. Il en résulte donc une augmentation de la quantité des cyt b-559 HP. Par ces observations, il semble que le taux de photooxydation du cyt b-559 HP par P680 soit plus faible en présence de cuivre, et qu'il y ait par conséquent une accumulation de cyt b-559 HP réduits et protonés après illumination chez les thylacoïdes inhibés par le cuivre.

Une méthode pour vérifier cette dernière hypothèse est de mesurer la photooxydation du cyt b-559 par P680 suite à l'addition de DCMU (Cramer et Whitmarsh, 1977), chez des thylacoïdes incubés en absence et en présence de 100 μM CuSO_4 . Il est admis que le DCMU bloque la photoréduction du cyt b-559 au niveau de Q_B et/ou des PQ (McCauley et al., 1987; Arnon et Tang, 1988; Ortega et al., 1989). Dans ces conditions, la photooxydation nette du cyt b-559 peut donc être observée. A la Fig.47, l'addition de DCMU après la photoréduction complète des cyt b-559 cause une baisse rapide du signal chez les thylacoïdes non-traités au cuivre, jusqu'à un niveau d'oxydation inférieur au niveau initial. Cependant, chez les thylacoïdes traités au cuivre, le taux et le degré d'oxydation sont beaucoup plus faibles. Ces résultats indiquent clairement que la présence de cuivre diminue la photooxydation du cyt b-559 par P680.

Les résultats présentés dans cette section montrent pour la première fois l'interaction du cuivre avec le cyt b-559.

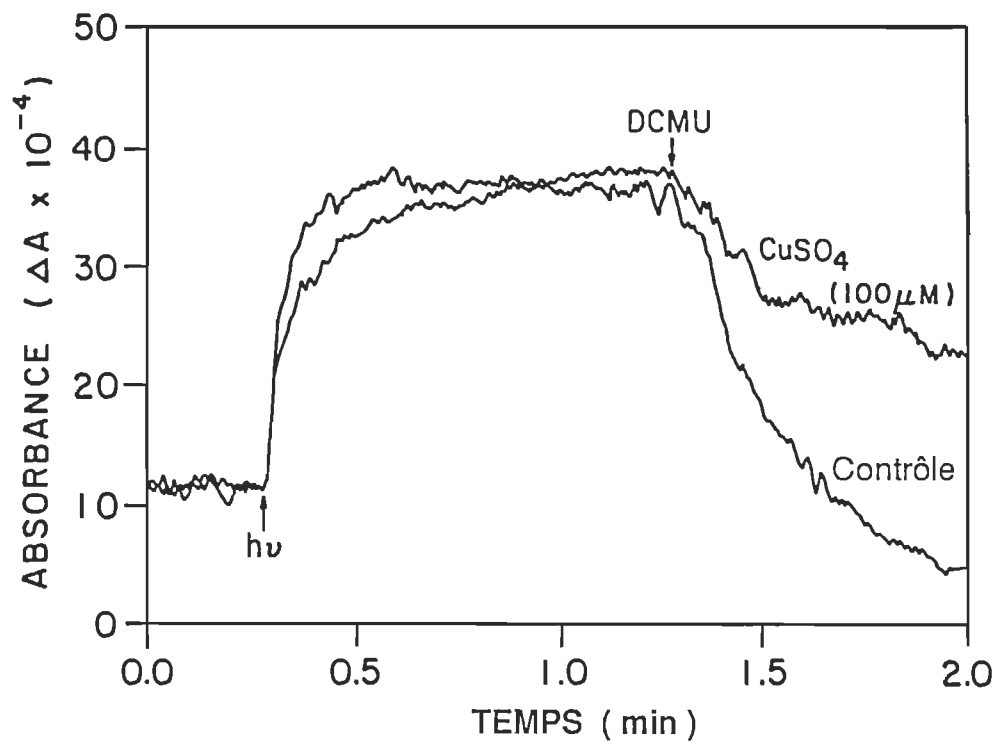


Fig.47 Photooxydation du cytochrome b-559 induite par l'addition de 5 μM DCMU chez des thylacoïdes incubés à l'obscurité en absence et en présence de 100 μM CuSO_4 .

Les conséquences de cette interaction sur l'activité photochimique du PSII sont difficiles à évaluer puisque le rôle du cyt b-559 dans le PSII est toujours mal défini. Toutefois, nous pouvons faire certaines relations entre d'une part, la baisse du rapport cyt b-559 HP/LP causée par le cuivre (Fig.44) et d'autre part, les baisses du rapport cyt b-559 HP/LP causées par plusieurs traitements inhibant l'activité du PSII: détergents, vieillissement, NH_2OH , FCCP, etc. Tous ces différents traitements entraînent des modifications structurales de nature inconnue dans les thylacoïdes (Cramer et Whitmarsh, 1977). Aussi, le cuivre causerait possiblement des modifications structurales au niveau du site Q_B (Mohanty et

al. 1988; Vierke et Struckmeier 1977)). De telles modifications structurelles pourraient expliquer l'interaction entre le cuivre et le DCMU, où une partie de la fluorescence variable chez les thylacoïdes inhibés par le cuivre est restaurée par l'addition de DCMU (Fig.39 et 41). En effet, le mécanisme d'action proposé pour le DCMU est un changement conformationnel au site Q_B causé par la fixation du DCMU sur la protéine de 32 kDa (Trebst, 1981). Yamaghishi et Fork (1987) suggéraient que la fixation du DCMU au site Q_B affectait l'arrangement spatial des polypeptides environnants et empêchait ainsi la photoréduction du cyt b-559. De plus, l'addition de DCMU restaurait la fluorescence des chloroplastes traités avec le FCCP (McCauley et al., 1987), lequel affecte vraisemblablement le cyt b-559 via des modifications de la structure membranaire des thylacoïdes (Maroc et Garnier, 1979). En considérant toutes ces observations dans le sens de mes résultats, je propose qu'une certaine interaction structurelle pourrait expliquer la restauration par le DCMU d'une partie de la fluorescence chez les thylacoïdes inhibés par le cuivre.

Les modifications structurelles des thylacoïdes discutées plus haut n'ont jamais été définies, à l'exception peut-être de Cramer et al. (1974), qui attribuaient l'effet du FCCP sur le cyt b-559 à une augmentation de la microviscosité membranaire dans les thylacoïdes. Actuellement, nous ne pouvons donc que spéculer sur les modifications structurelles causées par le cuivre au niveau du PSII. Cependant, il existe des observations intéressantes reliant les effets du cuivre, du manganèse

et de l'hydroxylamine avec le cyt b-559. Tout d'abord, il existe une corrélation entre la quantité de cyt b-559 HP et la quantité de manganèse dans le PSII (Horton et Croze, 1977). Bendall (1982) affirmait que l'interaction entre le manganèse et le cyt b-559 découlait d'un effet conformationnel du manganèse sur la structure du PSII. Ensuite, il est connu que l'hydroxylamine diminue la quantité de cyt b-559 HP (Horton et al., 1977; Cramer et Whitmarsh, 1977). Cette baisse est accompagnée par une perte du manganèse associé au complexe de dégagement d'oxygène et d'une perte d'activité des PSII Horton et al., 1977). Jursinic et Stemler (1983) et Renger et al. (1986) ont trouvé que l'hydroxylamine affectait aussi le site de fixation des herbicides (DCMU et atrazine) au niveau du site Q_B de la protéine de 32 kDa. Jursinic et Stemler (1983) expliquaient cet effet par la destruction des quinones ou leur environnement lipidique au niveau des cotés oxidant et réducteur du PSII. Enfin, il est intéressant de rappeler que le cuivre diminue aussi la quantité des cyt b-559 HP à l'obscurité (Fig.44) et que le manganèse peut restaurer sous certaines conditions l'activité des PSII inhibés par le cuivre (Habermann, 1969; Samuelsson et Oquist, 1980). De toutes ces considérations et de mes résultats, je suggère que l'effet du cuivre sur l'activité des PSII découle de changements conformationnels modifiant l'environnement nécessaire à une interaction adéquate entre le site Q_B , le cyt b-559 et P680.

3.7 Evidences de l'inhibition des transitions d'états chez les thylacoïdes d'orge suite à l'effet du cuivre sur le PSII

Dans les thylacoïdes, le transport d'électrons partant de l'eau jusqu'au NADP est possible grâce aux réactions photochimiques des PSII et PSI. Afin de maximiser l'efficacité photosynthétique des thylacoïdes, il existe un mécanisme de régulation permettant de distribuer adéquatement l'énergie d'excitation nécessaire pour optimiser les taux de réactions photochimiques au niveau des PSII et PSI (Fork et Satoh, 1986). Cette régulation est réalisée par les transitions d'états, qui sont déterminées selon l'état d'excitation des deux photosystèmes. Le mécanisme à la base de cette régulation est la phosphorylation des CCL-II par une enzyme kinase. L'activité de la kinase est stimulée lorsque les molécules de PQ situées entre les deux photosystèmes sont réduites (Chow et al., 1981; Barber, 1983; Bassi et al., 1988). L'illumination des thylacoïdes en absence d'accepteurs d'électrons provoquera la réduction des PQ. L'activité de la kinase sera stimulée et la phosphorylation des CCL-II sera donc favorisée. L'addition du groupe phosphate à la surface des thylacoïdes granaires permet aux CCL-II de diffuser latéralement vers les PSI dans les thylacoïdes du stroma pour y déverser l'énergie excessive (Hader et Teveni, 1987). Ce phénomène se traduit par une baisse de la fluorescence émise par le PSII (Horton et Black, 1982; Fork et Satoh, 1986). L'objectif de cette section est de déterminer la relation entre l'inhibition du PSII par le

cuivre et les mécanismes de régulation de la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes.

Les procédures de phosphorylation des thylacoïdes consistaient tout d'abord à incuber à l'obscurité pendant cinq minutes les thylacoïdes en présence de différentes concentrations de cuivre. Ensuite, l'ATP (0.2 mM) était ajouté au début d'une période d'illumination de cinq minutes pour permettre la phosphorylation des CCL-II. Finalement, les thylacoïdes incubaient pendant 15 minutes à l'obscurité avant les mesures de fluorescence variable à la température de la pièce ou des spectres d'émission à 77°K. Le fluorure de sodium, NaF (5 mM), était présent dans le milieu de réaction pour inhiber la déphosphorylation des CCL-II par la phosphatase (Chow *et al.*, 1981, Bassi *et al.*, 1988).

La Fig.48 présente les intensités de fluorescence variable en fonction de la concentration de cuivre chez des thylacoïdes incubés en présence et en absence de ATP dans le milieu de resuspension. En absence de cuivre, l'addition de 0.2 mM ATP diminue l'intensité de la fluorescence variable de près de 30% suite à la phosphorylation des CCL-II. L'augmentation de la concentration de CuSO_4 entraîne une diminution de l'intensité de la fluorescence variable telle qu'observée à la Fig.39, avec un effet maximal à 30 μM . Le point important à remarquer est que la baisse de la fluorescence attribuée à la phosphorylation diminue lorsque l'inhibition par le cuivre augmente. Cette relation est présentée de façon claire à la Fig.49, où la baisse normalisée de fluorescence induite par l'ATP, soit:

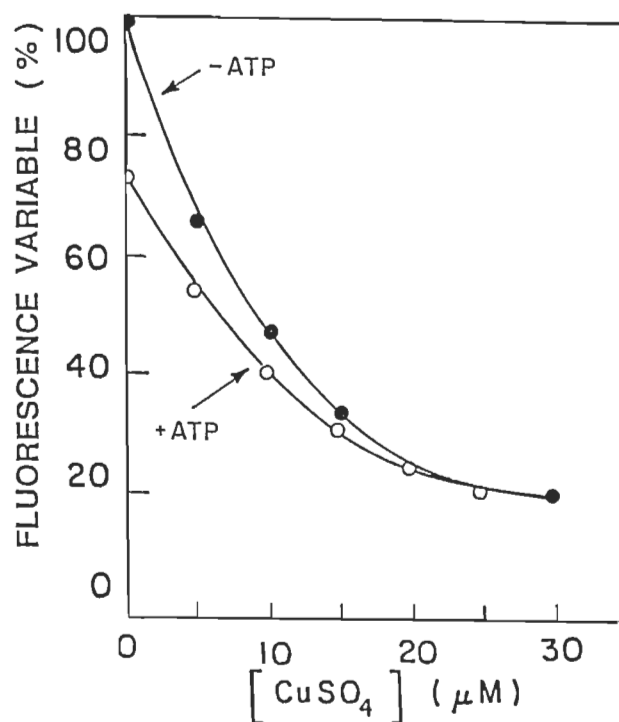


Fig.48 Intensités de la fluorescence variable en fonction de la concentration de CuSO_4 chez des thylacoïdes incubés en présence et en absence de 0.2 mM ATP.

$$[F_{vp}(-\text{ATP}) - F_{vp}(+\text{ATP})] / F_{vp}(-\text{ATP}),$$

est présentée en fonction de la concentration de cuivre. En absence de cuivre, ce rapport (0.28) est très proche de celui mesuré par Jennings et al. (1986), confirmant que la phosphorylation des CCL-II et leur migration vers le PSI est efficace sous les conditions expérimentales utilisées. De plus, nous pouvons constater que ce ratio diminue linéairement lorsque la concentration de cuivre augmente et atteint zéro à près de 25 μM de CuSO_4 . L'inhibition totale de la transition d'état à cette concentration est difficile à expliquer puisque plus de 20% de la fluorescence variable était toujours présente à

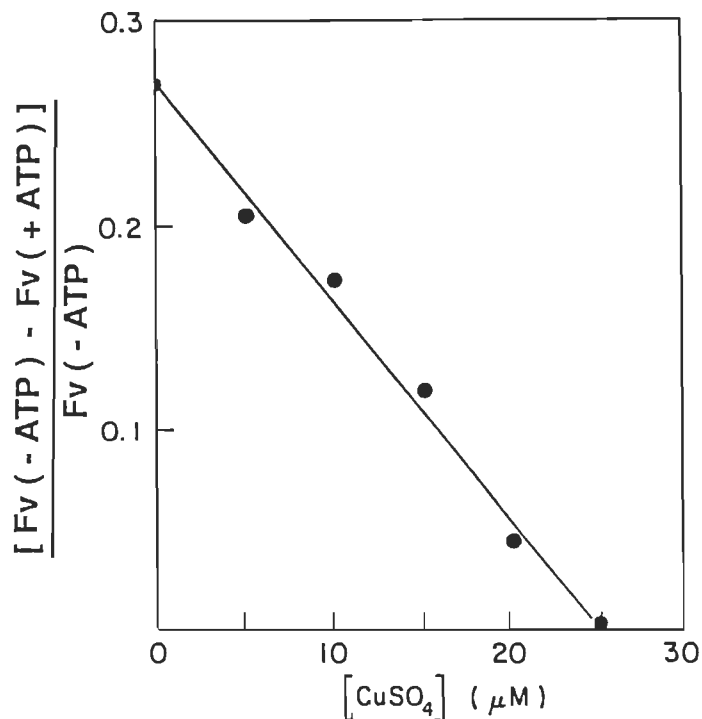


Fig.49 Baisse normalisée de la fluorescence variable attribuée à la phosphorylation des CCL-II en fonction de la concentration de CuSO_4 .

cette concentration (Fig.48), indiquant la présence d'un transport d'électrons produit par le PSII. Pour éclaircir ce point, l'analyse plus détaillée des courbes de fluorescence entre les niveaux D et P est instructive. Il est admis que la composante lente de la fluorescence (montée D-P) est associée aux PSII de type Q_B qui sont connectés à la chaîne des transporteurs d'électrons (Lavergne, 1982; Butko et Szalay, 1985; Guenther et al., 1988; voir aussi sections 1.2.3 et 3.3). Les PSII de type Q_B sont donc les seuls capables de réduire les PQ impliquées dans l'activation de la kinase responsable des transitions d'états. Les résultats présentés à la Fig.50 indiquent clairement que la fluorescence lente est

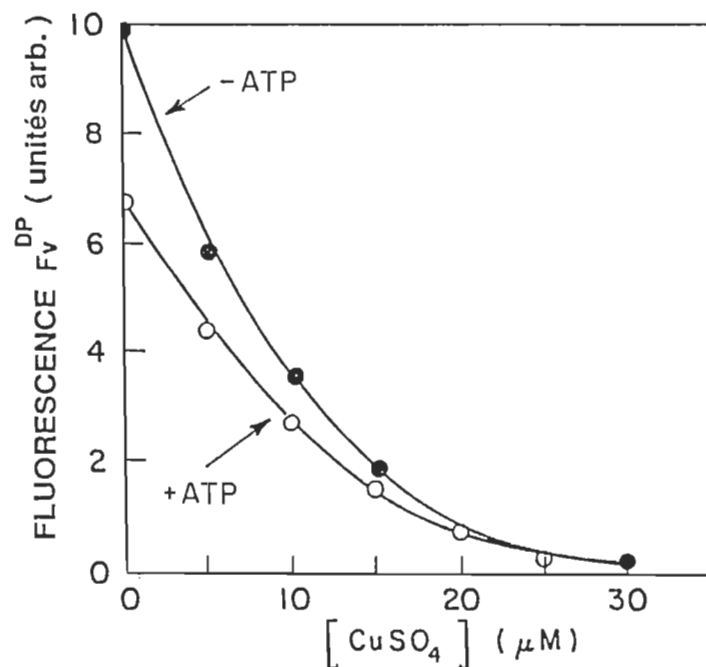


Fig.50 Intensités de la fluorescence variable lente (montée D-P) en fonction de la concentration de CuSO_4 chez des thylacoïdes incubés en présence et en absence de 0.2 mM ATP.

pratiquement disparue à 25 μM CuSO_4 (moins de 5%). Ceci est similaire à l'effet du mercure chez D.tertiolecta (section 3.3, Fig.24), où la fluorescence variable lente était plus susceptible à l'effet inhibiteur du mercure que la montée rapide O-I de la fluorescence. De plus, les résultats de la Fig.50 confirment de façon claire que la fluorescence lente est un bon indicateur de l'activité fonctionnelle de PSII de type Q_B et démontrent aussi que ces PSII sont les seuls capables d'assurer les transitions d'états.

Une autre évidence de l'inactivation des transitions d'états suite à l'effet inhibiteur du cuivre sur le PSII a été obtenue par les spectres de fluorescence mesurés à basse température (77°K). Ces spectres de fluorescence permettent

de distinguer la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes et sont donc très utiles pour étudier les transitions d'états (Krause et Behrend, 1983; Mawson et Cummins, 1986). La Fig.51 présente les spectres d'émission de la fluorescence à 77°K pour les thylacoïdes phosphorylés ou non en absence et en présence de 20 uM CuSO_4 , mesurés tel que décrit précédemment à la section 2.2.2. Les trois bandes caractéristiques sont visibles à 685, 694 et 740 nm. Ces bandes correspondent respectivement à l'émission de fluorescence originant du CCL-II, aux Chl du centre réactionnel du PSII et à celles du centre réactionnel du PSI (Krause et Weis,

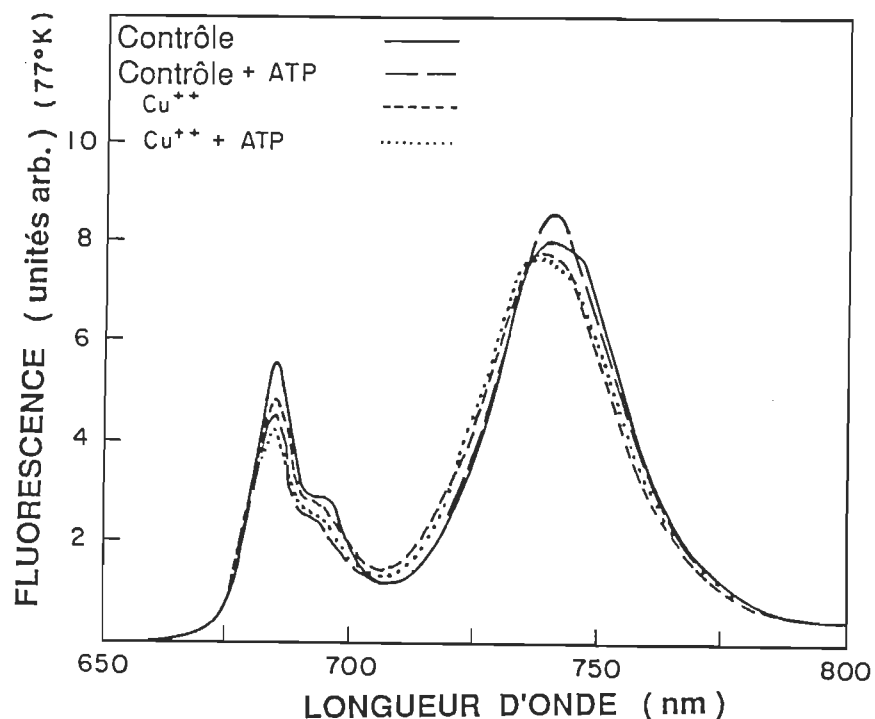


Fig.51 Spectres d'émission de fluorescence à basse température (77°K) chez des thylacoïdes non phosphorylés et phosphorylés (0.2 mM ATP) en absence et en présence de 20 uM CuSO_4 (Krause et Weis, 1984; Briantais et al., 1986). Elles indiquent la quantité

d'énergie d'excitation présentes dans les différents complexes chlorophylle-protéine à l'instant précis de la congélation (Krause et Weis, 1984; Briantais et al., 1986). Premièrement, la phosphorylation des thylacoïdes entraîne la baisse des pics associés au CCL-II (685 nm) et au centre réactionnel du PSII (694 nm) et augmente le pic du centre réactionnel du PSI (740 nm). Ces changements démontrent ainsi qu'une partie de l'énergie d'excitation arrivant aux complexes chlorophylle-protéine du PSII est dirigée vers le PSI après la phosphorylation. La présence de cuivre cause une baisse équivalente des trois pics. J'attribue cet effet du cuivre à la destruction par photooxydation des pigments chlorophylliens suite à l'exposition à la lumière (5 min) des thylacoïdes inhibés par le cuivre (Samuelsson et Oquist, 1980). Cette interaction de la lumière avec le cuivre au niveau des pigments photosynthétiques pourrait expliquer la stimulation bien connue de l'effet inhibiteur du cuivre par la lumière sur l'activité du PSII (Cedeno-Maldonado et al., 1972; Vierke et Struckmeier, 1978). De plus, les spectres montrent que l'incubation des thylacoïdes en présence de cuivre empêche la redistribution de l'énergie suite à l'addition d'ATP, indiquant que les mécanismes de transitions d'états sont inactivés chez les thylacoïdes dont l'activité des PSII est inhibée par le cuivre. Ces résultats sont présentés quantitativement au tableau 3. Le rapport des pics à 740 et 694 nm (exprimant la quantité d'énergie d'excitation reçue au PSI par rapport à celle reçue au PSII) montre que le rapport F_{740}/F_{694} augmente de 3.38 à 4.10 suite à la

phosphorylation. Cependant, ce rapport n'augmente que de 3.51 à 3.67 après la phosphorylation chez les thylacoïdes incubés en présence de 20 μM de CuSO_4 .

Les résultats présentés dans cette section démontrent que le processus de transitions d'états est inactivé suite à l'inhibition des PSII par le cuivre. De plus, j'ai démontré que les PSII de type Q_B , responsable de la fluorescence

Tableau 3. Effet de la phosphorylation sur les rapports des intensités de fluorescence aux pics F740/F694 mesurés à 77°K chez des thylacoïdes incubés en absence et en présence de 20 μM CuSO_4 .

Traitements	sans ATP	avec ATP
sans CuSO_4	3.38	4.10
avec CuSO_4 (20 μM)	3.51	3.67

variable lente (montée D-P), sont les seuls PSII impliqués dans les transitions d'états. Dans les conditions où la capacité des PSII à réduire les PQ est inhibée, les thylacoïdes ne peuvent donc plus assurer la redistribution de l'énergie d'excitation nécessaire pour optimiser les réactions photochimiques de la photosynthèse en fonction des conditions environ-

nementales.

CONCLUSIONS

Le propos général de cette thèse portait sur l'inhibition de l'activité photochimique du PSII par le cuivre et le mercure. Une telle recherche pourrait avoir une portée écologique puisque la photosynthèse semble être le premier processus physiologique affecté par ces métaux lourds (Overnell, 1976). Ainsi, les effets de ces inhibiteurs au niveau du PSII seraient à la base d'une baisse de production de la biomasse végétale, diminuant de cette façon l'entrée d'énergie dans la chaîne alimentaire (Barnes, 1980). Cependant, avant de répondre à ces questions, une étude approfondie des aspects biophysiques des inhibitions du PSII par le cuivre et le mercure était nécessaire. Cette recherche permettait i) de mieux caractériser ces effets inhibiteurs sur le PSII, ii) d'identifier quelques conséquences sur le transport d'électrons dans les thylacoïdes et iii) de mieux comprendre certains mécanismes fondamentaux encore mal définis du transport d'électrons au niveau du PSII.

Les résultats obtenus avec l'algue verte Dunaliella tertiolecta indiquent premièrement que les effets du cuivre et du mercure sur le PSII causent une diminution de l'activité photochimique des PSII observée par les baisses du rendement photochimique mesurée par la fluorescence variable et l'aire complémentaire. Cependant, le taux de photoréduction de l'accepteur primaire du PSII, Q_A , n'était pas affecté par les effets du cuivre et du mercure. La conclusion qui s'impose

suite à ces observations est que le cuivre et le mercure entraînent une inhibition des PSII de type tout ou rien, c'est-à-dire qu'une portion de la population des PSII dans les thylacoïdes est totalement inhibée alors que l'autre portion des PSII ne semble pas du tout affectée. C'est la première fois qu'une telle conclusion peut être faite à partir d'observations directes de l'activité photochimique des PSII. Récemment, Hsu et Lee (1988) affirmaient la même chose pour l'effet du cuivre sur les PSII dans des thylacoïdes d'épinards, une affirmation faite seulement à partir de la relative insensibilité de la montée rapide (O-I) de la fluorescence vis-à-vis le cuivre.

Cette conclusion basée sur mes résultats fait la distinction entre deux populations de PSII définies selon leur susceptibilités envers les effets inhibiteurs des métaux lourds. Des mesures plus approfondies m'ont permis d'identifier que les PSII de type Q_B sont les plus sensibles à l'effet du cuivre et du mercure. Cette observation a d'importantes conséquences physiologiques puisque les PSII de type Q_B sont les seuls responsables du transport linéaire d'électrons, allant de l'eau jusqu'au NADP (Chylla et Whithmarsh, 1987). Une des conséquences de l'inhibition des PSII de type Q_B par le cuivre chez des thylacoïdes d'orge (section 3.7) est l'inactivation des mécanismes de redistribution de l'énergie d'excitation entre les PSII et PSI. Un tel effet résulte de l'inhibition de la réduction des PQ, dont l'état rédox représente le signal régulateur à la base des transitions

d'états dans les thylacoïdes. Ce mécanisme de régulation a pour but d'optimiser le transport d'électrons entre les deux photosystèmes et de fournir une protection contre un excès d'énergie d'excitation arrivant aux photosystèmes (Fork et Satoh, 1986). Ces résultats peuvent donc signifier une plus grande susceptibilité des PSII inhibés par le cuivre et le mercure vis-à-vis la photoinhibition, si aucun autre mécanisme n'intervient pour dissiper l'excès d'énergie arrivant au PSII.

Par ailleurs, l'analyse de l'atténuation de la fluorescence par le mercure a permis de démontrer que cet inhibiteur diminue l'intensité de la fluorescence chez D.tertiolecta vraisemblablement suite à la fixation avec au moins quatre sites d'interaction au niveau du PSII. Ces quatre sites d'interaction pourraient être reliés aux quatre atomes de manganèse situés dans le complexe de dégagement d'oxygène. Ces résultats ont été obtenus grâce à une modification originale de la méthode Stern-Volmer sur la base de l'analyse Lineweaver-Burk utilisée pour les enzymes allostériques (Segel, 1975). Cette nouvelle modification de la méthode Stern-Volmer peut être très utile dans l'étude de l'atténuation de la fluorescence par un inhibiteur affectant un fluorophore (ex. protéine) via plusieurs sites coopératifs de fixation.

Les mesures spectrophotométriques présentées dans cette thèse apportent une contribution importante à la compréhension des effets inhibiteurs du cuivre et du mercure au niveau du PSII. Tout d'abord, les résultats indiquent clairement que ni le cuivre ni le mercure n'affectent significativement la

photochimie primaire au niveau du centre réactionnel des PSII, telle que mesurée par le changement électrochromique C-550. Il y a donc toujours chez les thylacoïdes inhibés par le cuivre et le mercure une accumulation de charges négatives au site Q_A , responsable du changement électrochromique "C-550" attribué à une molécule de phéophytine subissant le champs électrique produit dans le centre réactionnel. Ces résultats contrastent en apparence avec les baisses de fluorescence et de dégagement d'oxygène causées par ces métaux lourds (Figs 29, 30 et 39).

Par contre, l'étude des interactions du cuivre et du mercure avec le cyt b-559 chez les thylacoïdes d'orge a révélé les natures distinctes des inhibitions sur l'activité des PSII causées par ces deux métaux lourds. Tout d'abord, il a été démontré pour la première fois que l'effet du mercure provoque l'induction d'un transport cyclique d'électrons autour du centre réactionnel du PSII. En effet, le mercure annule la photoréduction du cyt b-559 mesurée par le changement d'absorbance entre 559 et 570 nm (Fig.33). Cet effet est interprété comme résultant de la stimulation de l'oxydation du cyt b-559 par P680 lors du transport cyclique d'électrons au niveau du PSII (Heber et al., 1979; Arnon et Tang, 1988). De plus, cette conclusion est supportée par le fait que le mercure ne modifie aucunement le rapport cyt b-559 HP/LP (Fig.34). Le transport cyclique d'électrons autour du PSII impliquant le cyt b-559 serait peut-être à la base d'un mécanisme physiologique de défense contre les effets néfastes du pouvoir oxydant

de P680⁺ maintenu au niveau du centre réactionnel lorsque le transport d'électrons en provenance de l'eau est bloqué (Bendall, 1982). Ces conditions favorisent la photoinhibition et la peroxidation des lipides membranaires (Theg et al., 1986). De plus, ce transport cyclique serait peut-être un transport d'électrons alternatif permettant une certaine accumulation de protons dans le lumen des thylacoïdes nécessaire à la production d'ATP (Arnon et Tang, 1988).

Quant à l'effet du cuivre, celui-ci est très différent de l'effet du mercure. Le cuivre augmente légèrement mais significativement l'amplitude du changement d'absorbance lors la photoréduction du cyt b-559 et modifie la proportion des cyt b-559 HP et LP après une incubation des thylacoïdes à l'obscurité. Ces interactions du cuivre avec le cyt b-559, décrites pour la première fois, sont interprétées dans cette thèse comme résultant de l'effet du cuivre sur la structure membranaire et/ou polypeptidique du PSII. Des effets du cuivre sur la conformation du PSII ont déjà été proposés dans le passé (Vierke et Struckmeier, 1977). Récemment, Mohanty et al. (1989) suggéraient un effet du cuivre sur la conformation de la protéine 32 kDa comprenant le site Q_B, sans pouvoir expliquer la nature des modifications. Kyle et al. (1984) ont proposé un transport cyclique d'électrons autour du PSII pour relier les effets conformationnels sur la structure du site Q_B causés par la photoinhibition avec la baisse de la fluorescence variable. Cependant, un tel transport cyclique ne peut expliquer les effets du cuivre sur l'activité des

PSII. La démonstration d'un effet évident du cuivre sur le taux de photooxydation du cyt b-559 par le centre réactionnel du PSII constitue une première indication de la nature des modifications structurelles causée par le cuivre au niveau du PSII: le cuivre causerait possiblement une perte d'interaction entre le cyt b-559 et le centre réactionnel du PSII. Par le fait même, ces conclusions contribuent à une meilleure compréhension du rôle toujours "énigmatique" du cyt b-559, en mettant en évidence l'importance des interactions structurelles entre celui-ci et le centre réactionnel du PSII.

Les résultats présentés dans cette thèse pourraient remettre en question certaines conclusions antérieures concernant les sites d'action de divers inhibiteurs sur le côté oxydant du PSII. En effet, la restauration de l'activité des PSII inhibés suite à l'addition de donneurs d'électrons pourrait résulter d'une diminution du transport cyclique d'électrons autour du PSII. Il semble donc que le manque de connaissances concernant les fonctions du cyt b-559 et de ses interactions avec les autres composantes du PSII limite notre compréhension de plusieurs effets inhibiteurs sur le transport d'électrons dans le photosystème II.

Il existe plusieurs conditions environnementales qui, en plus des métaux lourds, affectent le transport d'électrons sur le côté oxydant du PSII. Mentionnons par exemple le stress hydrique, les basses températures, les fortes intensités lumineuses et autres polluants (voir section 1.5). Ces effets inhibiteurs, diminuent l'intensité de la fluorescence varia-

ble, et pourraient avoir certaines analogies avec soit l'effet inhibiteur du mercure ou soit celui causé par le cuivre. Les conclusions de cette thèse mettent en évidence l'importance de considérer dans l'avenir l'implication du cyt b-559 sur le transport d'électrons dans le PSII sous ces conditions non-optimales, afin de mieux évaluer les effets inhibiteurs réels et leurs conséquences sur la résistance des végétaux à plus long terme contre les différents stress environnementaux.

REFERENCES

- Andréasson E., Svensson P., Weisbull C. et Albertsson P.A. (1988) Separation and characterization of stroma and grana membranes - evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 936, 339-350.
- Andréasson L.-E. et Vanngard T. (1988) Electron transport in photosystem I and II. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 39, 379-411.
- Anonyme (1987) DW-2000 UV-Vis Spectrophotometer. Operator's Manual Version 1.0. SLM Instruments Inc., Urbana, IL 61801 USA
- Aoki K., Ideguchi T., Kakuno T., Yamashita J. et Horio T. (1986) Effects of NaCl and glycerol on photosynthetic oxygen-evolving activity with thylacoid membranes from halophilic green alga Dunaliella tertiolecta. *J. Biochem.* 100, 1223-1230.
- Arnon D.I. et Tang G.M.-S. (1988) Cytochrome b-559 and proton conductance in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. USA* 85, 9524-9528.
- Barber J. (1983) Membrane conformational changes due to phosphorylation and the control of energy transfer in photosynthesis. *Photobiochem. Photobiophys.* 5, 181-190.
- Barnes R.S.K. (1980) Fundamentals of Aquatic Ecosystems. Eds. R.S.K. Barnes et K.H. Mann. Blackwell Scient. Publ., Oxford.
- Bassi R., Giacometti G.M. et Simpson D.J. (1988) Changes in the organization of stroma membranes induced by in vivo state 1-state 2 transition. *Biochim. Biophys. Acta* 935, 152-165.
- Ben-Amotz A. (1980) Glycerol production in the alga Dunaliella In Biochemical and Photosynthetic Aspects of energy production. éd. A. San Pietro, Academic Press, New York.
- Bendall D.S., Davenport H.E. et Hill R. (1971) Cytochrome components in chloroplasts of the higher plants. *Meth. Enzymol.* 23, 327-344.
- Bendall D.S. (1982) Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 683, 119-151.
- Bendall D.S. et Rolfe S.A. (1987) Characterization of chloroplast cytochromes. *Meth. Enzymol.* 148, 259-273.
- Bidwell R.G.S. (1979) Plant Physiology. 2^{ème} éd., MacMillan Publis. Co. Inc., New York.
- Black M.T., Brearly T.H. et Horton P. (1986) Heterogeneity in chloroplast photosystem II, *Photosynth. Res.* 8:193-207.
- Blubaugh D.J. et Govindjee (1988) Kinetics of the bicarbonate effect and the number of bicarbonate-binding sites in thylacoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 936, 208-214.
- Bohner H., Bohme H. et Boger P. (1980) Reciprocal formation of plastocyanine and cytochrome b-553 and the influence of cupric ions on photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 592, 103-112.
- Brand L.E. Brand, Sunda W.G. et Guillard R.R.L. (1986) Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96, 225-250.

- Briantais J.-M., Vernotte C., Krause G.H. et Weis E. (1986) Chlorophyll-a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In Light Emission by Plants and Bacteria, Eds. Govindjee, Fork D.C. et Ames J. Academic Press, New York. pp.539-583.
- Butler W.L. (1972) On the primary nature of fluorescence yield changes associated with photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3420-3422.
- Butler W.L. et Matsuda H. (1983) Possible role of cytochrome b-559 in photosystem II. In The Oxygen Evolving System of Photosynthesis. Eds Inoue Y. et al. Academic Press, Tokyo. pp.113-122.
- Butko P. et Szalay L. (1985) Photosystem II and its connection to the electron transport chain during the life cycle of Chlorella. Photobiochem. Photobiophys. 10, 93-103.
- Cahen D., Malkin S., Shochat S. et Ohad I. (1976) Development of photosystem II complex during greening of Chlamydomonas reinhardtii y-1. Plant Physiol. 58, 257-267.
- Calvin M. et Bassham, J.A. (1962) The Photosynthesis of Carbon Compounds. Benjamin, New York.
- Canaani O., Havaux M. et Malkin S. (1986) Hydroxylamine, hydrazine and methylamine donate electrons to the photooxidizing side of photosystem II in leaves inhibites due to water stress. Biochim. Biophys. Acta 851, 151-155.
- Cedeno-Maldonado A., Swader J.A., et Heath R.L. (1972) The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. Plant Physiol. 50, 698-701.
- Chen R.F. (1976) The effect of metal cations on protein fluorescence. In Biochemical Fluorescence: Concepts. Eds. Chen R.F. et Edelhoch, H., Vol. 2, pp.573-606, Marcel Dekker Inc. New York.
- Cheniae G.M. et Martin I.F. (1971) Effects of hydroxylamine on photosystem II. Plant Physiol. 47, 568-575.
- Chiaudani G. et Vighi M. (1978) The use of Selenastrum capricornutum batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21, 316-329.
- Chow W.S., Telfer A., Chapman D.J. et Barber J. (1981) State1-State2 transition in leaves and its association with ATP-induced chlorophyll fluorescence quenching. Biochim. Biophys. Acta 638, 60-68.
- Chylla R.A. et Whitmarsh J. (1987) Evidence for slow turnover in a fraction of photosystem II complexes in thylacoid membranes. Biochim. Biophys. Acta 894, 562-571.
- Chylla R.A. et Whitmarsh J. (1989) Inactives photosystem II complexes in leaves. Turnover rate and quantitation. Plant Physiol. 90, 765-772.
- Clayton R.K. (1980) Photosynthesis. Physical mechanisms and chemical patterns. Cambridge University Press. Cambridge.
- Cotton F.A. et Wilkinson G. (1988) Advanced Inorganic Chemistry. 5^{ème} éd. John Wiley & Sons, New York.
- Cramer W.A., Fan H.N. et Bohme H. (1971) High and low potential states of the chloroplast cytochrome b-559 and thermodynamic control of non-cyclic electron transport transport.

- J. Bioenerg. 2, 289-303.
- Cramer W.A., Horton P. et Donnell J.J. (1974) Inhibition of chemical oxidation and reduction of cytochromes f and b-559 by carbonylcyanide p-trifluoromethoxy phenylhydrazone. Biochim. Biophys. Acta 368, 361-370.
- Cramer W.A. et Whithmarsh J. (1977) Photosynthetic cytochromes Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 133-172.
- Crofts A.R. et Wraight C.A. (1983) The electrochemical domain of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 726, 149-183.
- Deehan G.A., Gorter de Vries H. et Duysens L.N.M. (1976) Correlation between flash-induced oxygen evolution and fluorescence rise kinetics in the 0 to 16 microsecond range in Chlorella pyrenoidosa during incubation with hydroxylamine. Biochim. Biophys. Acta 430, 265-281.
- de Filippis L.F., Hampp R. et Ziegler H. (1981) The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on Euglena. Arch. Microbiol. 128, 407-411.
- Delieu T. et Walker D.A. (1972) An improved cathode for the measurements of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol. 71, 201-225.
- Deng X. et Melis A. (1986) Phosphorylation of the light harvesting complex II in higher plant chloroplasts: effect on photosystem II and photosystem I absorption cross-section. Photobiochem. Photobiophys. 13, 41-52.
- Falkowski P.G., Fujita Y., Ley A. et Mauzerall D. (1986) Evidence for cyclic electron flow around Photosystem II in Chlorella pyrenoidosa. Plant Physiol. 81, 310-312.
- Florès S., Graan T. et Ort D.R. (1983) Measurement of the permeability of the chloroplast thylakoid membrane to amine buffers. Photobiochem. Photobiophys. 6, 293-304.
- Fork D.C. et Satoh, K. (1986) The control by state transitions of the distribution of the distribution of excitation energy in photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 335-361.
- Fork D.C., Murata N. et Sato N. (1979) Effect of growth temperature on the lipid and fatty acid composition and the dependence of temperature of light-induced redox reactions of cytochrome-f and of light energy redistribution in the thermophylic blue-green alga Synechococcus lividus. Plant Physiol. 63, 524-530.
- Foyer C.H. (1984) Photosynthesis. John Wiley & Sons, New York.
- Ghanotakis D.F. et Yocum C.F. (1985) Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. Photosynth. Res. 7, 97-114.
- Ghanotakis D.F., Demetriou D.M. et Yocum C.F. (1987) Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center and a 28 kDa Chl-a binding protein. Biochim. Biophys. Acta 891, 15-21.
- Gounaris K., Whitford D. et Barber J. (1983) The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving photosystem II preparation. FEBS Lett. 163, 230-234.
- Govindjee, Kambara T. et Coleman, W. (1985) The electron donor side of photosystem: the oxygen evolving complex. Photochem. Photobiol. 42, 187-210.
- Govindjee et Satoh, K. (1986) Fluorescence properties of

- chlorophyll-b and chlorophyll-c containing algae. In Light Emission by Plants and Bacteria, Eds. Govindjee, Fork D.C. et Ames J. Academic Press, New York pp.497-537.
- Graan T. et Ort, D.R. (1986) Detection of oxygen-evolving photosystem II center inactive in plastoquinone photoreduction. *Biochim. Biophys. Acta* 852, 320-330.
- Guenther J.E., Nemson J.A. et Melis A. (1988) Photosystem II stoichiometry and chlorophyll antenna size in Dunaliella salina (green alga). *Biochim. Biophys. Acta*, 934, 108-117.
- Habermann H.M. (1969) Reversal of copper inhibition in chloroplast reactions by manganese. *Plant Physiol.* 44, 331-336.
- Hader D.-P. et Tevini M. (1987) General Photobiology. Pergamon Press, Oxford.
- Haehnel, W. (1986) Plastocyanin. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and Light Systems". Encyclopedia of Plant Physiology, Vol.19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp.547-559.
- Harrison P.J., Waters R.E. et Taylor F.J.R. (1980) A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16, 28-35.
- Haworth P. (1983) Protein phosphorylation-induced SI-SII transitions are dependent on thylakoid membrane microviscosity. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 145-154.
- Heber U., Kirk M.R. et Boardman N.K. (1979) Photoreactions of cytochrome b-559 and cyclic electron flow in photosystem II of intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 546, 292-306.
- Homann P.H. (1987) The relations between the chloride, calcium and polypeptides requirements of photosynthetic water oxidation. *J. Bioenerg. Biochem.* 19, 105-123.
- Honeycutt R.C. et Krogmann D.W. (1972) Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate. *Plant Physiol.* 49, 376-380.
- Hoober J.K. (1984) Chloroplasts. Plenum Press, New York.
- Horton P. et Croze E. (1977) The relationship between the activity of chloroplast photosystem II and the midpoint oxido-reduction potential of cytochrome b-559. *Biochim. Biophys. Acta* 462, 86-101.
- Horton P. (1981) The effect of redox potential on the kinetics of fluorescence induction in pea chloroplasts. I. Removal of the slow phase. *Biochim. Biophys. Acta* 635, 105-110.
- Horton P. et Black M.T. (1982) On the nature of fluorescence decrease due to the phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 22-27.
- Horton P. et Hague A. (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 932, 107-115.
- Hsu B.D. et Lee J.Y. (1988) Toxic effects of copper on photosystem II in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 87, 116-119.
- Israelachvili J.N., Marcelja S. et Horn R.G. (1980) Physical principles of membranes organization. *Q. Rev. Biophys.* 13, 126-200.
- Jennings R.C., Islam K. et Zucchelli G. (1986) Spinach-thyla-

- koid phosphorylation: studies on the kinetics of changes in photosystem antenna size, spill-over and phosphorylation of light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochim. Biophys. Acta* 850, 483-489.
- Joliot P. et Kok B. (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. In Bioenergetics of Photosynthesis, Ed. Govindjee, Academic Press, New York.
- Jursinic P.A. et Stemler A. (1983) Changes in [^{14}C]Atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II. *Plant Physiol.* 73, 703-708.
- Jursinic P.A. et Dennenberg, R. (1988) Thylakoid photosystem II activity supported by the non-quinone acceptor Q400 and an ancillary quinone acceptor Aq. *Biochim. Biophys. Acta* 935, 225-235.
- Kaniuga Z., Sachnowicz B. et Michalski W. (1978) Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. I. Reactivation of Hill reaction activity inhibited on the cold and dark storage of detached leaves and intact plants. *Planta* 140, 121-128.
- Karuktis K.K., Boegeman S.C., Fruetel J.A., Gruber S.M. et Terris M.H. (1987) Multivariate analysis of photosystem II fluorescence quenching by substituted benzoquinones and naphthoquinones. *Biochim. Biophys. Acta* 891, 256-264.
- Karuktis, K.K., Gruber S.M., Fruetel J.A. et Boegeman S.C. (1988) Quenching of chlorophyll fluorescence by substituted anthraquinones. *Biochim. Biophys. Acta* 932, 84-90.
- Kessler E. (1986) Limits of growth of five Chlorella species in the presence of toxic heavy metals. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73, 123-128.
- Kimimura M. et Katoh S. (1972) Studies on electron transport associated with photosystem I 1. Functional site of plastocyanin; inhibitory effects of HgCl_2 on electron transport and plastocyanine in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 283, 279-292.
- Klimov V.V., Klevanik A.V. et Shuvalov V.A. (1977) Reaction of the pheophytine in the primary light reaction of photosystem II. *FEBS Lett.* 82, 183-186.
- Krause G.H. et Behrend U. (1983) Characterization of chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts by fluorescence spectroscopy at 77 °K. II. ATP-dependent quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 723, 176-181.
- Krause G.H. et Weis E. (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signal. *Photosyn. Res.* 5, 139-157.
- Kühlbrandt W (1984) Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex. *Nature* 307, 478-480.
- Kyle D.J., Ohad I. et Arntzen C.J. (1984) Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4070-4074.
- Lakowicz J.R. (1984) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.

- Lavergne J. (1982) Two types of primary acceptor in chloroplasts photosystem II. II Reduction in two successive photoacts. *Photobiochem. Photobiophys.* 3, 273-285.
- Lavorel J., Breton J. et Lutz M. (1986) Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic systems. In Light Emission by Plants and Bacteria, Eds. Govindjee, Fork D.C. et Ames J. Academic Press, New York. pp. 58-99.
- Lehninger A.L. (1982) Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure. 2^{ème} éd., Worth, New York.
- Malkin S., Armond P.A., Mooney H.A. and Fork D.C. (1981) Photosystem II photosynthetic unit sizes from fluorescence induction in leaves. Correlation to photosynthetic capacity. *Plant Physiol.* 67, 570-579.
- Manodori A. et Melis A. (1986) Cyanobacterial acclimation to photosystem I and Photosystem II light. *Plant Physiol.* 82, 185-189.
- Margulies M.M. (1972) Effect of cold storage of bean leaves on photosynthetic reactions of isolated chloroplasts. Inability to donate electrons to photosystem II and relation to manganese content. *Biochim. Biophys. Acta*, 267, 96-103.
- Maroc, J. et Garnier, J. (1979) Photooxidation of the cytochrome b-559 in the presence of various substituted 2-anilothiophenes and of some other compounds, in Chlamydomonas reinhardtii. *Biochim. Biophys. Acta* 548, 374-385.
- Martin B. et Ort D.R. (1982) Insensitivity of water-oxidation and photosystem II activity in tomato in chilling temperatures. *Plant Physiol.* 70, 689-694.
- Mawson B.T. et Cummins W.R. (1986) The kinetics of *in vivo* state transitions in mesophyll and guard cell chloroplasts monitored by 77 K fluorescence emission spectra. *Plant Physiol.* 82, 873-879.
- McCauley S.W., Melis A., Tang G.M.-S. et Arnon D.I. (1987) Protonophores induce plastoquinol oxidation and quench chloroplast fluorescence: Evidence for a cyclic, proton-conducting pathway in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 8424-8428.
- Melis A. (1985) Functional properties of PSIIb in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 808, 334-342.
- Melis A. et Schreiber U. (1979) The kinetic relationship between the C-550 absorbance change, the reduction of Q and the variable fluorescence yield change in chloroplasts at room temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 547, 47-57.
- Melis A. et Homann P.H. (1975) Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 21, 431-437.
- Melis A. et Schreiber U. (1979) The kinetic relationship between the C-550 absorbance change, the reduction of Q and the variable fluorescence yield change in chloroplasts at room temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 547, 47-57.
- Miles D., Bolen P., Farag S., Goodin R., Lutz J., Moustafa A., Rodriguez B. et Weil C. (1973) Hg⁺⁺-a DCMU independent electron acceptor of photosystem II. *Biochem. Biophys. Res.*

- Comm. 50, 1113-1119.
- Mitchell P (1974) A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatase. *FEBS Lett.* 43; 189-194.
- Mohanty N., Vass I. et Demeter S. (1989) Copper affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, Q_A . *Plant Physiol.* 90, 175-179.
- Morissette J.C., Meunier P. et Popovic R. (1988) An automatic integrating fluorometer using an Apple-II and Scope-85. *Rev. Sci. Instrum.* 59, 934-936.
- Morissette J.C. et Popovic R. (1987) A new method for the separation of the constant and the variable fluorescence of chlorophyll-a in in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149, 385-390.
- Nanba O. et Satoh K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 109-112.
- Ort D.R. (1986) Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and Light Systems". Encyclopedia of Plant Physiology, Vol.19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp.143-196.
- Ortega J.M., Hervas M. et Losada M. (1988) Redox and acid-base of cytochrome b-559 in photosystem II particles. *Eur. J. Biochem.* 171, 449-455.
- Ortega J.M., Hervas M. et Losada M. (1989) Location of cytochrome b-559 between photosystem II and photosystem I in non-cyclic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 244-251.
- Overnell J. (1976) Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Mar. Biol.* 38, 335-342.
- Owens T.G. (1986) Light-harvesting function in the diatom Phaeodactylum tricornutum. II Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.* 80, 739-746.
- Papageorgiou G. (1975) Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In Bioenergetics of Photosynthesis. Ed. Govindjee, Academic Press, New York.
- Popovic R., Fraser D., Vidaver W. et Colbow K. (1984) Oxygen-quenched chlorophyll-a fluorescence and electron transport in barley during greening. *Physiol. Plant.* 62, 344-348.
- Popovic R., Carpentier R. et Morin L. (1988) Determination of fluorescence inductions in a PSII submembrane fraction affected by additives. *J. Plant Physiol.* 132, 754-757.
- Popovic R., Colbow K., Vidaver W. et Bruce D. (1983) Evaluation of O_2 in brown algal chloroplasts. *Plant Physiol.* 73, 889-892.
- Powles S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. rev. Plant Physiol.* 35, 15-44.
- Radmer R. et Kok B. (1975) Kinetic observation of the system II electron acceptor pool isolated by mercuric ion. *Biochim. Biophys. Acta* 357, 177-180.
- Renganathan M. et Bose S. (1989) Inhibition of the primary photochemistry of photosystem II by copper in isolated pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 974, 247-253.

- Renger G., Hagemann et Fromme R. (1986) The susceptibility of the p-benzoquinone-mediated electron transport and atrazine binding to trypsin and its modification by CaCl_2 in thylakoids and PSII membrane fragments. *FEBS Lett.* 203, 210-214.
- Rolfe S.A. et Bendall D.S. (1989) The role of an extrinsic 9 kDa polypeptide in oxygen evolution by photosystem II particles from Phormidium laminosum. *Biochim. Biophys. Acta* 973, 220-226.
- Samson G. et Popovic R. (1988) Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotox. Envir. Safety* 16, 272-278.
- Samuelsson G. et Oquist G. (1980) Effects of copper on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of Spinacia oleracea. *Plant Cell Physiol.* 21, 445-454.
- Satoh K. et Katoh S. (1981) Fluorescence induction in chloroplasts isolated from the green alga, Bryopsis maxima. IV. The I-D dip. *Plant Cell Physiol.* 22, 11-21.
- Segel I.H. (1975) Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, New York
- Shioi Y., Tamai H., et Sasa T. (1978) Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 19, 203-209.
- Siegenthaler P.A. et Rawyler A. (1986) Acyl lipids in thylakoid membranes: distribution and involvement in photosynthetic functions. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and Light Systems". *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp.693-705.
- Singh D.P. et Singh S.P. (1987) Action of heavy metals on Hill activity and O_2 evolution in Anacystis nidulans. *Plant Physiol.* 83, 12-14.
- Staehelin L.A. (1986) Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and Light Systems". *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp.48-57.
- Strain H.H., Cope B.T. et Svec W.A. (1972) Analytical procedures for the isolation, identification, estimation, and investigation of the chlorophylls. In *Meth. Enzymol.* 23, 452-476.
- Theg S.M., Filar L.J. et Dilley R.A. (1986) Photoinactivation of chloroplasts already inhibited on the oxidizing side of PSII. *Biochim. Biophys. Acta* 849, 104-111.
- Thorner J.P. (1986) Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and Light Systems". *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp.
- Thielen A.P.G.M. et van Gorkom H.J. (1981) Energy transfer and quantum yield in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 637, 439-446.
- Trebst A. (1981) Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and

- energy conservation sites. Meth. in Enzymol. 69, 675-715.
- Tsujimoto H.Y. et Arnon D.I. (1985) Differential inhibition by plastoquinone analogues of photoreduction of cytochrome b-559 in chloroplasts. FEBS Lett. 179, 51-54.
- van Gorkom H.J. (1974) Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion. Biochim. Biophys. Acta 347, 439-442.
- Vierke G. et P. Struckmeier (1977) Binding of copper on the photosynthetic membrane and its correlation with inhibition of electron transport in class II chloroplasts. Z. Naturforsch. 32C, 605-610.
- Vierke G. et Struckmeier (1978) Inhibition of millisecond fluorescence by copper (II) in spinach chloroplasts. Z. Naturforsch. 33C 266-270.
- Wada K. et Arnon D.I. (1971) Three forms of cytochrome b-559 and their relation to the photosynthetic activity of chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3064-3068.
- Walker D.A. (1971) Chloroplasts (and grana): Aqueous (including high carbon fixation ability). Meth. Enzymol. 23, 211-220.
- Walker D.A., Cerovic Z.G. et Robinson S.P. (1987) Isolation of intact chloroplasts: General principles and criteria of integrity. In Meth. Enzymol. 148, 145-157.
- Walker N.A. et Pitman M.G. (1976) Measurement of fluxes across membranes. In Transport in Plants II. Part A, Eds Lüttge U. et Pitman M.G., pp 93-128. Spriger-Verlag, Berlin.
- Whithmarsh J. (1986) Mobile electron carriers in thylakoids. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and Light Systems". Encyclopedia of Plant Physiology, Vol.19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp.508-527.
- Widger W.R., Cramer W.A., Hermodson M. et Herrmann R.G. (1985) Evidence for a hetero-oligomeric structure of the chloroplast cytochrome b-559. FEBS Lett. 191, 186-190.
- Wiltens J., Schreiber U. et Vidaver W. (1978) Chlorophyll fluorescence induction: an indicator of photosynthetic activity in marine algae undergoing dessication. Can. J. Bot. 56: 2787-2794.
- Yamaghashi A. and Fork D.C. (1987) Photoreduction of Q_A , Q_B and cytochrome b-559 in an oxygen-evolving photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium Synechococcus sp. Arch. Biochem. Biophys. 259, 124-130.
- Yocum F.Y. et Guikema J.A. (1977) Photophosphorylation associated with photosystem II cyclic photophosphorylation catalyzed by p-phenylenediamine. Plant Physiol. 49, 33-37.
- Youvan D. et Marrs B. (1987) La photosynthèse. Pour la Science 118, 50-57.